



UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGIA

TESIS DOCTORAL

EVALUACIÓN *IN VIVO* DE LA SUSTANTIVIDAD DE LA CLORHEXIDINA AL 0,2% EN DIFERENTES ECOSISTEMAS ORALES

Lucía García-Caballero Pérez



La **Dra. Inmaculada Tomás Carmona**, profesora del Departamento de Estomatología de la Universidad de Santiago de Compostela

El **Dr. Pedro Diz Dios**, profesor del Departamento de Estomatología de la Universidad de Santiago de Compostela

HACEN CONSTAR:

Como Directores de la Tesis Doctoral que lleva por título “EVALUACIÓN *IN VIVO* DE LA SUSTANTIVIDAD DE LA CLORHEXIDINA AL 0,2% EN DIFERENTES ECOSISTEMAS ORALES”, realizada por la Licenciada en Odontología Dña. Lucía García-Caballero Pérez, que cumple todos los requisitos para ser presentada y defendida ante el oportuno Tribunal para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Santiago de Compostela.

Dra. I. Tomás Carmona

Dr. P. Diz Dios

L. García-Caballero Pérez

Santiago de Compostela, 5 octubre de 2011

A Rubén

Agradecimientos

Al hacer balance después de un trabajo como una Tesis doctoral, se da uno cuenta del gran número de personas con las que se está en deuda. Deseo expresar mi más sincero AGRADECIMIENTO:

En primer lugar al Prof. Pedro Diz Dios, que me orientó ya antes de matricularme en Odontología y me abrió las puertas de la Unidad de Pacientes Especiales cuando aún era una alumna de la licenciatura. Investigador brillante y espléndido orador, estando a su lado es imposible no aprender. Gracias a él he podido entrar en el mundo de la investigación de la mano de un maestro excepcional. Su accesibilidad constante y su don de hacer fácil lo difícil me han ayudado mucho a lo largo de todos estos años.

A la Prof. Inmaculada Tomás Carmona, modelo a seguir en investigación. A pesar de su juventud, sus dotes científicas y su enorme capacidad de trabajo le han permitido publicar ya un gran número de artículos de primera línea, de los que somos partícipes todos los que colaboramos a su lado. De ella he aprendido muchísimo y, sobre todo, he aprendido que la mejor forma de investigar es siendo entusiasta, meticulado y estricto.

A los Prof. Javier Fernández Feijóo y Jacobo Limeres Posse, que han sido mis maestros en el arte de la clínica. Sólo tengo palabras de agradecimiento hacia ellos por todo lo que me han enseñado y ayudado a lo largo de estos años. Muchas gracias Javier, además, por haber confiado en mí y proporcionarme mi primera oportunidad laboral.

A la Dra. Mariela Cousido González, juntas pasamos innumerables horas contando bacterias y gracias a eso tuve el enorme placer de conocerla. Me has contagiado tu optimismo en

múltiples ocasiones y siempre me has dado muy buenos consejos. Gracias, es un privilegio el haber podido trabajar contigo.

A todos los miembros de la Unidad de Pacientes Especiales, por su apoyo constante, y a los voluntarios, que soportaron estoicamente las férulas.

A la profesora Rosalía Gallego, por ayudarme con sus amplios conocimientos informáticos y por su disponibilidad en todo momento.

A Mercedes Rivas, del servicio de Microscopía de la RIADT. Sin su dominio de la Microscopía Confocal esta Tesis no podría haberse llevado a cabo. Mil gracias.

Al servicio de Anatomía Patológica del CHUS, especialmente al Laboratorio de Inmunohistoquímica. Gracias a Inés y a Elena.

Al Instituto de Cerámica y a la Unidad de Soplado de Vidrio, gracias a ellos pude conseguir los discos para las férulas, uno de los ejes de esta investigación.

También me gustaría agradecer esta Tesis a mis padres. Ellos saben que, de alguna manera, son coautores, por todos los ánimos que me han dado a lo largo de este proyecto.

A mi padre, excelente universitario y mejor persona, porque “me metió el gusanillo” de la investigación y porque no he podido tener mejor ejemplo a seguir, en todos los sentidos. Al terminar la carrera él me recomendó que me formara, que no tuviera prisa y,

una vez más, no se equivocaba. Todos sus consejos han sido siempre los mejores.

A mi madre, que es un apoyo constante y fundamental para mí. Siempre tiene las palabras adecuadas y el optimismo que a mí me falta. Magnífica docente y apasionada por su trabajo, además de excelente madre. Ella me ha inculcado que el esfuerzo y el trabajo son fundamentales, que no hay que rendirse nunca.

A mi hermano, que ha formado parte activamente de esta tesis ofreciéndose como voluntario siempre que lo he necesitado, demostrándome que su generosidad no tiene límites. Él vivió en primera persona el nacimiento de esta investigación desde las inicialmente desesperanzadoras pruebas preliminares hasta el final. Gracias por esto y, sobre todo, por haber sido siempre un gran amigo.

A mis amigas: Ana, Berta, Elena, Irene, Iria, Lucía F., Lucía R. y Lydia, porque esta Tesis lleva cinco años siendo una constante en nuestras conversaciones. Gracias por vuestra paciencia y por vuestro ánimo continuo.

Y por supuesto a Rubén, que también ha vivido esta Tesis muy de cerca desde el principio. Muchas gracias por tu apoyo y comprensión. Tu capacidad de ver el lado positivo de todo, incluso de lo malo, me sigue fascinando y me sirve de motor en el día a día. Gracias por estar siempre ahí.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. BACTERIAS Y BIOFILMS	3
1.2. EL BIOFILM ORAL	9
1.2.1. Concepto	9
1.2.2. Formación	11
1.2.3. Estructura y composición	16
1.2.4. Propiedades	21
- Resistencia a antimicrobianos.....	21
- Expresión genética alterada en los biofilms	23
- Comunicación entre bacterias.....	24
- Heterogeneidad fisiológica	27
- Capacidad adaptativa	29
1.3. MODELOS DE ESTUDIO <i>IN VITRO</i> DEL BIOFILM ORAL	30
1.3.1. Biofilms constituidos por una única especie bacteriana	34
1.3.2. Biofilms constituidos por más de una especie bacteriana	37
1.3.3. Limitaciones de los modelos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> desestructurado	42
1.4. MODELOS DE ESTUDIO <i>IN VIVO</i> DEL BIOFILM ORAL	44
1.4.1. Aparatos removibles y sustratos para recoger biofilm de placa dental.....	44
1.4.2. Aplicabilidad de la microscopía de barrido láser confocal	46
1.4.3. Características estructurales del biofilm oral	50
- Grosor	51
- Arquitectura	52
- Viabilidad bacteriana.....	56
- Topografía bacteriana.....	59

1.5. ELIMINACIÓN/CONTROL DEL BIOFILM ORAL MEDIANTE AGENTES ANTIMICROBIANOS	66
1.5.1. Efecto de la clorhexidina sobre modelos de biofilm de placa dental <i>in vitro</i>	69
- Biofilm monoespecie	69
- Biofilm multiespecie	71
1.5.2. Efecto de la clorhexidina sobre modelos de biofilm de placa dental <i>in vivo</i>	75
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	79
3. MATERIAL Y MÉTODOS	85
3.1. SELECCIÓN DEL GRUPO DE ESTUDIO	87
3.2. EVALUACIÓN DE LA SUSTANTIVIDAD DE LA CLORHEXIDINA SOBRE LA FLORA SALIVAL APLICANDO MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA	87
3.2.1. Recogida de muestras salivales	87
3.2.2. Procesamiento y análisis de las muestras salivales	88
3.3. EVALUACIÓN DE LA SUSTANTIVIDAD DE LA CLORHEXIDINA SOBRE LA FLORA SALIVAL Y EL BIOFILM DE PLACA DENTAL	91
3.3.1. Confección de una férula porta-discos individualizada	91
3.3.2. Recogida de muestras de saliva y biofilm de placa dental	94
3.3.3. Procesamiento y análisis de las muestras de saliva y biofilm de placa dental	95
3.4. INFLUENCIA DEL RITMO CIRCADIANO EN LA SUSTANTIVIDAD DE LA CLORHEXIDINA SOBRE LA FLORA SALIVAL Y EL BIOFILM DE PLACA DENTAL	98
3.4.1. Recogida y procesamiento de muestras de saliva y biofilm de placa dental	98
3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS	99

3.5.1. Evaluación de la sustantividad de la clorhexidina sobre la flora salival aplicando microscopía de epifluorescencia	99
3.5.2. Evaluación de la sustantividad de la clorhexidina sobre la flora salival y el biofilm de placa dental	100
3.5.3. Influencia del ritmo circadiano en la sustantividad de la clorhexidina sobre la flora salival y el biofilm de placa dental	101
4. RESULTADOS	103
4.1. EVALUACIÓN DE LA SUSTANTIVIDAD DE LA CLORHEXIDINA SOBRE LA FLORA SALIVAL	105
4.1.1. Análisis mediante microscopía de epifluorescencia	105
4.1.2. Análisis mediante técnicas microbiológicas	109
4.2. EVALUACIÓN DE LA SUSTANTIVIDAD DE LA CLORHEXIDINA SOBRE LA FLORA SALIVAL Y EL BIOFILM DE PLACA DENTAL.....	110
4.2.1. Grosor, viabilidad bacteriana y características estructurales del biofilm de placa dental	110
4.2.2. Sustantividad de la clorhexidina al 0,2% y su influencia en el grosor del biofilm de placa dental.....	111
4.2.3. Sustantividad de la clorhexidina al 0,2% en saliva <i>versus</i> biofilm de placa dental	117
4.3. INFLUENCIA DEL RITMO CIRCADIANO EN LA SUSTANTIVIDAD <i>IN VIVO</i> DE LA CLORHEXIDINA.....	121
4.3.1. Influencia sobre el grosor del biofilm de placa dental	121
4.3.2. Influencia sobre la flora salival y el biofilm de placa dental	123
5. DISCUSIÓN	129
5.1. EVALUACIÓN DE LA SUSTANTIVIDAD DE LA CLORHEXIDINA SOBRE LA FLORA SALIVAL APLICANDO MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA.....	131
5.2. EVALUACIÓN DE LA SUSTANTIVIDAD DE LA CLORHEXIDINA SOBRE LA FLORA SALIVAL Y EL BIOFILM DE PLACA DENTAL.....	135

5.3. INFLUENCIA DEL RITMO CIRCADIANO EN LA SUSTANTIVIDAD DE LA CLORHEXIDINA SOBRE LA FLORA SALIVAL Y EL BIOFILM DE PLACA DENTAL.....	143
6. CONCLUSIONES	149
7. BIBLIOGRAFÍA	153

ABREVIATURAS

B-PD: Biofilm de placa dental

CDFF: Fermentador de biofilm de profundidad constante

CHX: Clorhexidina

CIB: Concentración de inhibición del biofilm

CLSM: Microscopía/microscopio de barrido láser confocal

CMI: Concentración mínima inhibitoria

CSP: Péptido estimulador de la competencia

ENJ: Enjuague

FISH: Hibridación *in situ* fluorescente

RG: Reducción del grosor

RV: Reducción de la viabilidad

UE: Único enjuague

UFC: Unidades formadoras de colonias

YP: Yoduro de propidio

1. INTRODUCCIÓN

1.1. BACTERIAS Y BIOFILMS

Se denominan procariotas a las células que no tienen un núcleo diferenciado, por lo que su material genético se encuentra disperso en el citoplasma. Casi sin excepción, los organismos basados en células procariotas son unicelulares y su representante más genuino son las bacterias. Las procariotas representan la forma de vida predominante en la Tierra porque, además de ubicuas, son inextinguibles, ya que existen en gran número y son muy heterogéneas. Por lo tanto se puede afirmar que en realidad “no vivimos en la era del ser humano, sino que vivimos en la era de las bacterias” (*Gould, 1997*).

Hasta hace unos años, cuando una válvula cardíaca, un catéter o una prótesis articular se infectaban, se buscaban las causas en el área tisular de contacto entre el huésped y el dispositivo. Esta búsqueda resultaba a menudo infructuosa, ya que en el estudio histológico no se identificaban gérmenes; sin embargo, una vez retirado el dispositivo, la infección desaparecía (*Barcat, 2005*). Además de que las técnicas de diagnóstico eran inadecuadas, en aquel momento se desconocía que los gérmenes podían adherirse sobre superficies inertes y crecer formando colonias, cuya conexión, junto con la matriz extracelular que ellos mismos secretan, les confiere unas propiedades que no exhiben los elementos bacterianos por separado (*Costerton y Stewart, 2001*). Esta forma de vida de las bacterias recibe el nombre de biopelícula o *biofilm* (en lo sucesivo emplearemos el término biofilm, por su mayor difusión en el ámbito científico) y es la más extendida en la naturaleza (*Barcat, 2005*), ya que está presente en la mayor parte de las superficies húmedas (*Costerton et al, 1999*). También es la más fructífera en términos de biomasa total, y de variedad y extensión de los hábitats colonizados (*Costerton et al, 1995*).

La mayoría de los microorganismos se encuentran en la naturaleza acoplados a superficies sobre las que crecen formando biofilms (*Marsh, 2005*). Estas poblaciones predominan en todos los sistemas acuáticos que presenten suficientes nutrientes, independientemente del tipo de ecosistema involucrado (*Costerton, 1995*). La formación de un biofilm sobre un sistema acuático generalmente satisface tres condiciones indispensables: 1. Las bacterias metabólicamente activas muestran una gran capacidad para adherirse a las superficies. 2. La extensión del biofilm está controlada por la cantidad de nutrientes disponibles para la duplicación celular y para la formación de la matriz de exopolisacáridos. 3. Las bacterias no se adhieren a superficies cuando el ecosistema es pobre en nutrientes.

Los biofilms se forman tanto sobre biotopos artificiales como naturales, desde la superficie de las rocas que se asientan en las orillas de los ríos, hasta el casco de los barcos en contacto directo con el agua, pasando por las lentes de contacto o la placa dental (Figura 1) (*Slavkin, 1997*). Ésta última representa probablemente la expresión de biofilm más estudiada de todas las que se han descrito en el ser humano, desde que en el siglo XVII un comerciante textil llamado Antoni van Leeuwenhoek, observó por primera vez unos “animalículos” en los restos orgánicos que cubrían la superficie de sus propios dientes. La necesidad de disponer de mejores lupas para controlar la calidad de las telas, impulsó a Leeuwenhoek a desarrollar un artefacto que resultó un prototipo de microscopio. A partir de ese momento comenzó a observar todo lo que le rodeaba: sangre, saliva, agua estancada, fibras musculares, vasos sanguíneos, e incluso llegó a describir con precisión algunas estructuras como los glóbulos rojos y los espermatozoides humanos. Dedicó largas horas a la observación y estudio de los “animalículos”, llegando a representarlos con dibujos minuciosos e incluso a clasificarlos en tres tipos: bacilos, cocos y espirilos. Él fue probablemente el primero en describir el biofilm que hoy conocemos

como “placa dental” y sus propiedades básicas de resistencia (*Slavkin, 1997*): observó que el vinagre interrumpía el movimiento de los “animalículos” extraídos de su boca (*ex vivo*), mientras que al enjuagarse con vinagre no encontraba el mismo efecto en las muestras tomadas posteriormente (*in vivo*).

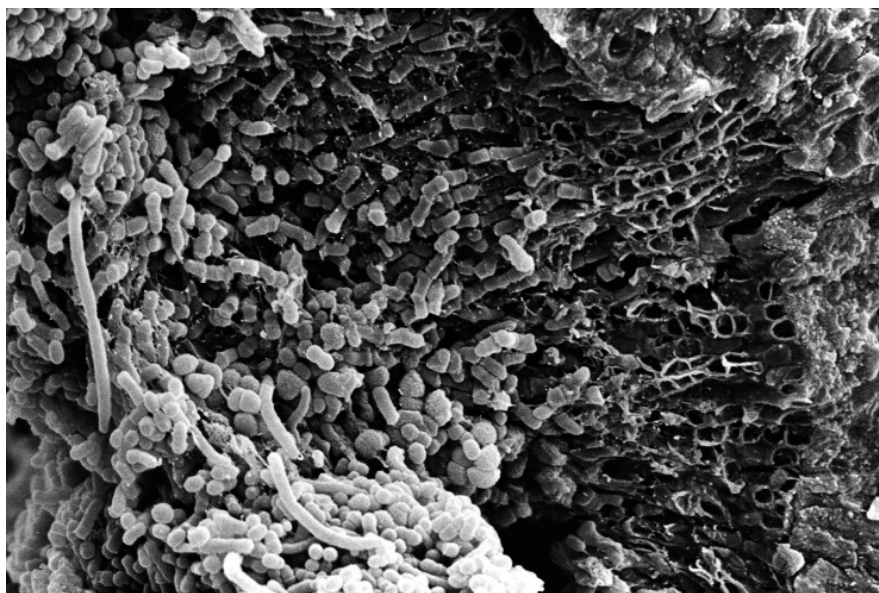


Figura 1. Imagen del biofilm bacteriano acumulado sobre la superficie del esmalte dentario (placa dental), obtenida con microscopía electrónica de barrido. Tomada de *Wellcome Images.ac.uk* (referencia 0037).

Entre las principales aportaciones posteriores destacan los trabajos de Black sobre “las placas gelatinosas de microbios del diente” y sus efectos sobre el esmalte subyacente (*Black, 1898*) y los de Zobell sobre el patrón de crecimiento preferentemente sésil de los microorganismos (*Zobell, 1943*). Ya en la década de los 60, Gibbons y Banghart reintrodujeron el concepto de formación de placa y su matriz extracelular en relación con las enfermedades orales (*Gibbons y Banghart, 1967*), y en 1976, Marshall reveló la participación de fibras muy finas de polímeros extracelulares que anclaban las bacterias a las superficies (*Marshall, 1976*).

Pero la teoría general sobre la ubicuidad de los biofilms y su descripción no fue promulgada hasta 1978 por el grupo de William Costerton (*Costerton et al, 1978*). Ellos fueron los primeros en señalar que las bacterias que coexisten formando biofilms constituyen el principal componente de la biomasa bacteriana presente en muchos hábitats. Además, al analizar la gran resistencia de las estructuras que formaban las *Pseudomonas* sobre las rocas de los arroyos, intuyeron que eso mismo ocurría en los catéteres, sugiriendo que los biofilms podrían tener importancia en la etiopatogenia de muchas enfermedades humanas. Según Costerton et al (*Costerton et al, 1978*), la mayor parte de las bacterias crecen en biofilms, rodeadas de una matriz constituida por polisacáridos y adheridas a las superficies, en ecosistemas acuáticos con suficientes nutrientes, subrayando además las diferencias existentes entre las bacterias sésiles y las planctónicas (*Costerton et al, 1978*).

Hoy sabemos que los biofilms representan la forma de asociación preferida por las bacterias, ya que éstos les proporcionan un entorno más seguro, y les ayudan a sobrevivir y crecer en ambientes más hostiles (*Costerton et al, 1999*). Sin embargo, durante mucho tiempo no fue el hábitat en el que la mayoría de los clínicos e incluso los microbiólogos imaginaban a las bacterias, que presumiblemente vivían como entidades microbianas individuales y aisladas (*Slavkin, 1997*). No fue hasta las décadas de los 80 y los 90 cuando se constató definitivamente que las asociaciones bacterianas estaban organizadas de una forma tan elaborada (*Lawrence et al, 1991*).

Si introducimos en Google (el buscador más utilizado en internet) el término *biofilm*, se encuentran nada más y nada menos que 1.810.000 resultados, y 306.000 si limitamos la búsqueda a *bacterial biofilm* (actualizado el 1 de Febrero de 2011). En Pubmed (un motor de búsqueda de libre acceso a la base de datos MEDLINE), en la misma

fecha, introduciendo la palabra *biofilm* encontramos 14.711 referencias y al introducir la expresión *bacterial biofilm* el resultado fue de 8.754.

En 1999, en un artículo publicado en la revista *Science*, Costerton et al apuntaron que un 65% de las enfermedades del mundo desarrollado estaban ocasionadas por biofilms (*Costerton et al, 1999*). Unos años más tarde, en 2004, el *National Institute of Health* (NIH) destacó la gran importancia clínica de los biofilms, al afirmar que podían explicar más del 80% de las infecciones del cuerpo humano.

Se ha confirmado que los biofilms están implicados en procesos infecciosos que comparten características clínicas: son crónicos, de evolución tórpida, presentan síntomas también de forma gradual y son difíciles de erradicar con el tratamiento antibiótico convencional. Se desarrollan preferiblemente sobre superficies inertes (dispositivos terapéuticos) o sobre tejido necrótico, aunque también pueden desarrollarse sobre tejidos vivos, como en el caso de la endocarditis. Estas infecciones son tan resistentes, que incluso los individuos que conservan indemnes sus mecanismos de respuesta inmunológica celular y humoral son incapaces de resolverlas. El tratamiento con antibióticos normalmente revierte los síntomas provocados por las células planctónicas, pero fracasa en el intento de destruir al biofilm. En consecuencia, estas infecciones suelen tener un carácter recurrente, y suelen precisar de diferentes ciclos de terapia antibiótica hasta que la comunidad bacteriana que puebla el biofilm es eliminada definitivamente (*Costerton et al, 1999*).

Se atribuyen a biofilms bacterianos múltiples infecciones que afectan a tejidos duros y blandos de la cavidad oral (como la caries y la periodontitis), al oído medio (como la otitis), al sistema músculo-esquelético, al tracto gastrointestinal y urogenital, y a los ojos. Otras enfermedades como la fibrosis quística, la endocarditis infecciosa o la

osteomielitis, y un gran grupo de infecciones nosocomiales que se asocian a catéteres de diálisis, a la administración de agentes quimioterápicos, a prótesis valvulares cardíacas, a suturas percutáneas, a dispositivos de fijación interna o a intubación traqueal, también se atribuyen a biofilms bacterianos. Como ya hemos señalado, estos microorganismos que conforman biofilms tienden a ser mucho más resistentes a los agentes antimicrobianos y hacen que sea mucho más difícil para el sistema inmunológico del huésped desarrollar una respuesta apropiada (*Hall-Stoodley y Stoodley, 2009*).

Costerton et al (*Costerton et al, 1999*) definieron el biofilm como “la comunidad estructurada de células bacterianas rodeadas por una matriz polimérica producida por ellas mismas, y adheridas a una superficie inerte o activa”. Posteriormente, Donlan y Costerton (*Donlan y Costerton, 2002*) propusieron la siguiente definición: “un biofilm es una comunidad bacteriana sésil inmersa en un medio líquido, caracterizada por bacterias unidas de forma irreversible bien a un sustrato o interfase, o bien entre sí, que se encuentran embebidas en una matriz de la sustancia polimérica extracelular producida por ellas mismas, y que exhiben un fenotipo alterado con respecto al índice de crecimiento y a la expresión de sus genes”. Esta definición, a diferencia de las anteriores, que no tenían en cuenta el fenotipo del biofilm, establece las propiedades del biofilm y por lo tanto se considera más completa. Las poblaciones bacterianas que forman una matriz y crecen sobre una superficie no constituyen necesariamente un biofilm. Por ejemplo, las bacterias que crecen sobre una placa de agar se comportan como células planctónicas varadas en una superficie y no muestran ninguna de las características inherentes a los verdaderos biofilms.

El biofilm representa el hábitat preferente de las bacterias (*Marsh y Bradshaw, 1995*) e implica la formación de una comunidad microbiana compleja que posee: 1) un sistema de homeostasis y circulatorio

primitivos -su principal componente es el agua (*Hope y Wilson, 2003*); 2) una cooperación metabólica; y 3) una capacidad de reacción de las células a su entorno, que hace que las bacterias que constituyen un biofilm difieran mucho de las planctónicas, aun siendo de la misma especie (*Costerton et al, 1995*). Además de variaciones en su fenotipo, las bacterias que crecen en biofilms difieren con respecto a las que están en suspensión en cuanto a su actividad enzimática, a la composición de la pared celular y a la estructura de la superficie. Todo ello implica alteraciones en la susceptibilidad a los agentes antimicrobianos (*Costerton et al, 1987*), que también estaría condicionada por los distintos ritmos de metabolismo bacteriano, las diferentes localizaciones dentro del biofilm y la inhibición por parte de la matriz de la difusión de los agentes antimicrobianos (*Costerton y Lewandowski, 1997*).

Se ha sugerido que las bacterias que conforman un biofilm presentan un fenotipo distinto al de sus equivalentes planctónicas y que organizadas de esta manera pueden llegar a ser hasta 250-500 veces más resistentes a un determinado antimicrobiano (*Costerton et al, 1995; Pratten y Wilson, 1999*).

1.2. EL BIOFILM ORAL

1.2.1. Concepto

En la boca, los biofilms se desarrollan espontáneamente sobre las superficies de los dientes, prótesis, implantes dentales y sobre el epitelio oral (*Slavkin, 1997*). Debido a diferencias en los nichos ecológicos inherentes a las diversas localizaciones intraorales, la microflora que coloniza la superficie de las mucosas difiere en su composición con respecto a la que integra la placa dental (*Marsh, 1994*). Ésta se define como una comunidad microbiana compleja que crece en forma de biofilm sobre la superficie del esmalte dentario (*Li et al, 2004*).

Está constituida por microorganismos embebidos en una matriz extracelular compuesta por polímeros de origen bacteriano y del propio huésped (Scheie, 1994; Marsh, 2004). Aunque se han involucrado más de 500 especies bacterianas en la placa dental (Kolenbrander *et al*, 2002; Foster y Kolenbrander, 2004), en trabajos recientes, aplicando técnicas de biología molecular, se han identificado hasta 1000 especies bacterianas diferentes (ten Cate, 2006). Por lo tanto, al hablar de placa dental, nos referimos a un biofilm adherente que se forma sobre todos los tejidos intraorales duros y blandos, que representa el principal agente etiológico de la caries y de la enfermedad periodontal (Fine, 1988).

La placa dental se considera un modelo especializado de biofilm microbiano, similar al que se desarrolla sobre diferentes superficies en muchos sistemas con un ambiente acuático (McHugh, 1999). La compacta disposición de las bacterias lo convierten en uno de los nichos ecológicos más prometedores para analizar tanto el comportamiento como las propiedades biológicas y fisiológicas del biofilm (Slavkin, 1997). En este sentido, se ha demostrado que el comportamiento de la placa dental se corresponde con el de un biofilm clásico (Socransky y Haffajee, 2002; Marsh, 2004) y que muchas de sus propiedades son comunes a las de cualquier otro biofilm existente en la naturaleza (Haffajee y Socransky, 2006; ten Cate, 2006).

En los biofilms dentales, al igual que en otros ecosistemas ricos en nutrientes, la mayoría de las células que los conforman son miembros de un consorcio en el que la yuxtaposición con células cooperadoras facilita las actividades metabólicas, ya que éstas proporcionan nutrientes adecuados y/o eliminan los productos de desecho (Costerton y Lewandowski, 1997). Las bacterias orales no existen como entidades independientes, y de hecho funcionan de una manera coordinada, organizadas en el espacio y totalmente integradas metabólicamente en

una comunidad. De esta forma, la “comunidad oral” adquiere unas propiedades bacterianas superiores a las que tendría la suma de las especies que la componen (*Marsh, 2004*). Estas especies compiten y cooperan en busca del establecimiento de una comunidad ideal (*Kolenbrander et al, 2002*).

Una vez formada, la placa dental se mantiene estable; esta estabilidad denominada homeostasis microbiana, es el resultado de un balance dinámico en las interacciones microbianas de sinergismo y antagonismo (*Sanders y Sanders, 1984*). La homeostasis se puede alterar, produciéndose cambios en la composición de la microflora que podrían inducir la aparición de la enfermedad (*Marsh, 1994*). La flora residente en un biofilm estable tiene una función de protección frente a especies exógenas (*McFarland, 2000*) y por ello el tratamiento para combatir la placa va más encaminado a controlarla que a eliminarla por completo (*Marsh, 1994*). La secuencia de crecimiento del biofilm protege a las bacterias adheridas frente a los ataques ambientales. Consecuentemente, los componentes activos de un enjuague antimicrobiano deben penetrar en la placa para alcanzar a las bacterias adheridas en los estadios iniciales de su formación, ya que son las que unen la masa de placa a la superficie del esmalte (*Landa et al, 1997*).

1.2.2. Formación

La formación del biofilm es un proceso biológico complejo, que implica la adhesión, separación y proliferación de las bacterias en contacto con diferentes superficies (*Rozen et al, 2001*). En sus etapas iniciales, las bacterias sésiles mantienen una relación estable con células de su misma especie o de otras especies, constituyendo microcolonias uni- o polibacterianas. Esta interconexión bacteriana y la producción de la matriz de exopolisacáridos condicionan el microambiente de cada biofilm. En respuesta a las circunstancias microambientales específicas, las bacterias de los distintos biofilms presentan diferentes patrones de

crecimiento y desarrollan gradualmente un biofilm maduro cada vez más complejo (*Costerton et al, 1995*).

La información de que disponemos sobre las complejas fases iniciales de la colonización microbiana de las superficies dentarias es limitada, particularmente en relación a las especies menos comunes. El estadio inicial implica la adsorción de determinadas especies microbianas, presentes en la cavidad oral, a la película de proteínas que recubre la superficie del diente, también conocida como película adquirida del esmalte (*Yao et al, 2003*). Los colonizadores pioneros son muy importantes porque, una vez adheridos al diente, aportan un sustrato de unión a los siguientes colonizadores y/o modifican las condiciones ambientales, determinando así las fases subsiguientes de formación del biofilm. Son, por lo tanto, una pieza clave en la sucesión microbiana que se produce en los biofilms dentales, porque en último caso determinarán la salud o la enfermedad oral (*Li et al, 2004*).

Existen dos interacciones físicas que tienen un papel especialmente relevante en la formación del biofilm y que están mediadas por reacciones intercelulares comunes: la coagregación y la coadhesión (*Foster y Kolenbrander, 2004*). La coagregación es el reconocimiento entre bacterias genéticamente diferentes -incluso de distintas especies- que coexisten en una suspensión planctónica, a través de determinadas moléculas de superficie. La coadhesión se refiere al reconocimiento mutuo entre una célula planctónica y otra que está unida a una superficie. El desarrollo de biofilms multiespecies está condicionado por las coagregaciones que se forman en la fase planctónica. Además, algunas bacterias coagregadas -como determinados *Streptococcus*-, se adaptan especialmente a la colonización primaria de las superficies acondicionadas por la saliva, favorecen la agregación de otras especies bacterianas y facilitan las relaciones simbióticas (*Foster y Kolenbrander, 2004*).

En la formación del biofilm se van sucediendo cambios secuenciales a medida que diferentes especies bacterianas se van adhiriendo y creciendo. Con la adhesión de cada nuevo tipo celular, nace una nueva superficie que favorece la adhesión de otras bacterias, resultando en una progresión de superficies y de cambios, concomitantes a la heterogeneidad de las especies. Debido a esta dinámica de crecimiento y adhesión, las poblaciones bacterianas de la cavidad oral están siempre sometidas a un constante cambio, que confirma la existencia de comunicación inter- e intraespecies (Kolenbrander *et al*, 2002). En el proceso de formación de un biofilm dental se diferencian 5 fases (Bernimoulin, 2003; Marsh, 2004; Rozen *et al*, 2001), que se detallan a continuación:

1. Adsorción selectiva a la superficie del diente de moléculas del huésped y de constituyentes bacterianos

Se constituye de esta manera la “película adquirida” -recubrimiento acelular de la superficie del esmalte- compuesta principalmente por elementos presentes en la saliva, como mucina, glicoproteínas y proteínas con un elevado contenido en prolina, histidina, enzimas y proteínas fosfatadas (Frías y Alsina, 2001), que van a promover la adherencia posterior de moléculas y células bacterianas, ya que constituyen una fuente importante de receptores para los colonizadores primarios (Kolenbrander *et al*, 2002). Además de proteínas, la película adquirida incluye constituyentes bacterianos, como fructosiltransferasa o glucosiltransferasa, que sintetizan los exopolisacáridos.

2. Adhesión de microorganismos pioneros a la superficie del diente

La adhesión de bacterias a una superficie representa un primer paso fundamental para la formación de un biofilm (Socransky y Haffajee, 2002). Se consideran microorganismos pioneros fundamentalmente dos géneros bacterianos: *Streptococcus* spp. y *Actinomyces* spp.

(Kolenbrander, 2000). Los *Streptococcus* spp. suponen el 60-90% de las bacterias que colonizan el diente en las primeras 4 horas después de efectuar una remoción mecánica profesional de la placa, y dentro de este género destacan los *mitis*, *sanguinis*, *oralis* y *gordonii* (Kolenbrander et al, 1999). También se consideran colonizadores pioneros: *Capnocytophaga* spp., *Eikenella* spp., *Haemophilus* spp., *Prevotella* spp. y *Veillonella* spp. (Kolenbrander et al, 2002). El ensamblaje entre estas bacterias pioneras y la película salival que recubre la superficie del esmalte se denomina “película de unión” (Busscher et al, 1995). Al destruirse esta biopelícula por la penetración de detergentes, solos o en combinación con actividades mecánicas (como las inherentes a la masticación, el habla, la deglución o el cepillado dentario), la placa adherida se desprende y deja al descubierto una superficie de esmalte limpia (Landa et al, 1997).

3. Coadhesión de colonizadores tardíos a colonizadores pioneros

Con la aparición de estructuras morfológicas inusuales se incrementa la biodiversidad del biofilm (Kolenbrander et al, 2000), lo que va a facilitar la organización funcional de la placa dental. Tanto en la fase de adhesión como en la de coadhesión, las bacterias de la flora oral utilizan polisacáridos como puntos de unión (Bowden y Li, 1997). A medida que la placa va madurando, la población de microorganismos Gram-negativos aumenta regularmente (Landa et al, 1997). Se considera que *Fusobacterium nucleatum* es una especie bacteriana -aunque no la única- a caballo entre los colonizadores pioneros y los tardíos, porque puede coadherirse tanto a unos como a otros, ejerciendo una función de puente entre ellos. Esta característica justifica la omnipresencia de esta bacteria, tanto en condiciones de salud como de enfermedad. Los puentes de coadhesión son auténticos mecanismos de cooperación, porque permiten la unión de dos especies que habitualmente no cooperan en este proceso (Kolenbrander et al, 2002).

4. Multiplicación de los microorganismos adheridos

La división celular persigue la consecución de un biofilm mixto, espacialmente organizado y funcional. Es en este momento en el que se produce la coagregación con otras especies bacterianas. Esta asociación no es aleatoria, sino que existen sociedades específicas dentro del mismo biofilm (Socransky y Haffajee, 2002). También en esta fase se conforma definitivamente la compleja matriz extracelular, constituida fundamentalmente por componentes salivales y una importante proporción de exopolisacáridos de origen bacteriano (Figura 2).

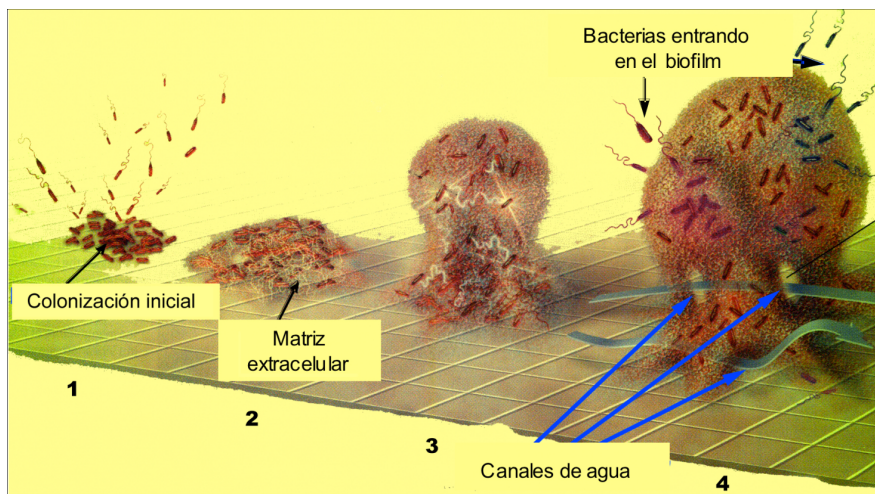


Figura 2. Fases de la formación del biofilm dental: 1- Colonización inicial. 2- Producción de matriz extracelular de exopolisacáridos. 3- Coagregación. 4- Multiplicación y maduración. *Modificado de Costerton y Stewart. Sci American 2001.*

5. Estabilidad y desprendimiento (Figura 3)

En esta última fase, el biofilm es mucho más estable en relación con el ambiente que lo rodea. Por último, las bacterias adheridas, en respuesta a los estímulos ambientales, tienen la posibilidad de desprenderse y colonizar nuevos hábitats (Socransky y Haffajee, 2002). El desprendimiento de células aisladas o de porciones de biofilm favorece

la formación de un nuevo biofilm, con las mismas características que el primitivo.

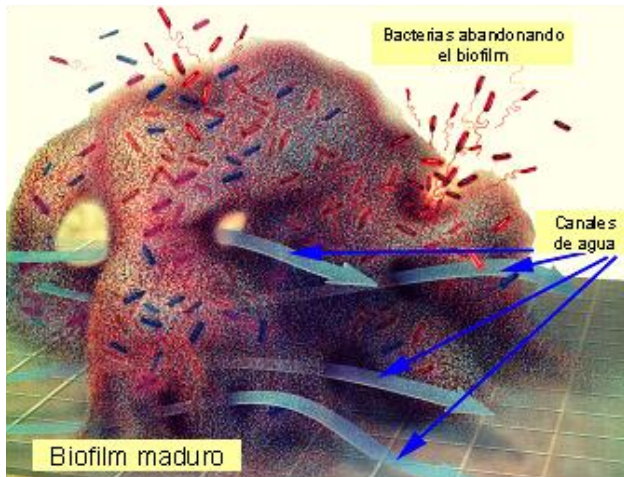


Figura 3. Biofilm maduro. Fase de estabilidad y desprendimiento. *Modificado de Costerton y Stewart. Sci American 2001.*

1.2.3. Estructura y composición

Con ayuda del microscopio confocal se ha demostrado que los biofilms generados *in vitro*, tanto mono- como polibacterianos, están generalmente constituidos por microcolonias bacterianas y por matriz extracelular. Tienen forma de torres o de setas envueltas en una matriz densa de exopolisacáridos, surcada por canales abiertos de agua que permiten el paso de nutrientes y la salida de desechos (Costerton y Lewandowski, 1997; Donlan y Costerton, 2002; Stewart, 2003; Barcat, 2005) (Figura 4). En este tipo de biofilms se distinguen dos regiones bien diferenciadas: la base y la superficie. La base la componen células firmemente empaquetadas en una capa que recubre la superficie del sustrato. La superficie está en contacto con la fase líquida; en esta zona las células están menos empaquetadas y existe una mayor proporción de líquido que en la zona basal. La topografía de esta región es irregular y está atravesada por canales de agua. Los biofilms presentan además huecos y estructuras columnares (“el tronco de los árboles” o “el pie de

las setas”), que protruyen de la superficie y que en la literatura anglosajona se conocen como *stacks* (Cowan *et al*, 2000; Hope *et al*, 2002).

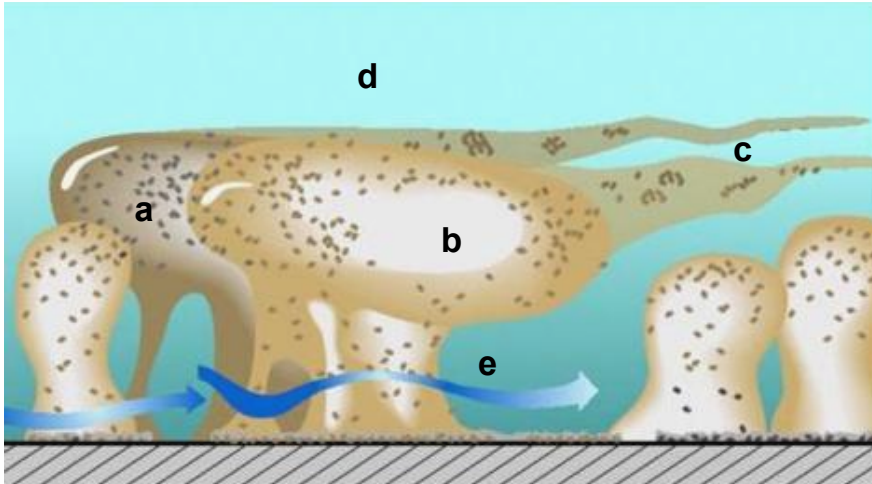


Figura 4. Heterogeneidad de la estructura del biofilm: a- Colonias bacterianas. b-Huecos en la matriz extracelular. c- Prolongaciones serpentiformes. d- Fase líquida. e- Canales de agua. Modificado del “Center for Biofilm Engineering” de la Universidad de Montana.

La estructura que hemos descrito corresponde a un biofilm de características típicas, pero puede modificarse por factores como la composición y la estructura del sustrato. En 1991, Lawrence *et al* (Lawrence *et al*, 1991) definieron como “arquitectura del biofilm” un patrón delimitado espacialmente y compuesto por una distribución variable de: células y agregados celulares (con polímeros extracelulares), huecos y canales de agua, que pueden ser continuación de la gran masa de fase líquida. Estos canales de agua tienen la capacidad de transportar solutos hacia y desde las profundidades del biofilm, pero no garantizan el acceso al interior de los grupos celulares (Stewart, 2003). La arquitectura del biofilm, especialmente la de las regiones más externas, tiene una importante influencia en su interacción con el ambiente local, sobre todo en el flujo de materiales y, como consecuencia, en su comportamiento metabólico. La manipulación de

esta arquitectura puede alterar la transferencia de masa líquida al conjunto del biofilm y puede facilitar el acceso a los agentes terapéuticos (Robinson et al, 2006).

La arquitectura de microcolonias y canales de agua de los biofilms sugiere la posibilidad de una estructura heterogénea dentro de estas comunidades microbianas complejas (ten Cate, 2006). Las bacterias de una determinada microcolonia tienen un cierto grado de homeostasis, relaciones espaciales opcionales con organismos cooperativos y un medio efectivo de intercambio de nutrientes y metabolitos con la gran masa de fase fluida (Costerton et al, 1995). El acceso a los nutrientes y la recogida de productos de desecho dependen de la posición de una determinada bacteria en el interior del biofilm, cuya estructura heterogénea proporciona “micronichos personalizados” que hacen posible una buena convivencia entre bacterias muy distintas fisiológicamente (Costerton y Lewandowski, 1997). Mientras las bacterias planctónicas tienen esencialmente relaciones transitorias con otras células, las que conforman los biofilms viven en comunidades microbianas en las que la disponibilidad de nutrientes depende en parte de la actividad metabólica de sus células vecinas (Costerton et al, 1994). Cada microcolonia debe definir su tamaño, interrumpiéndose la división celular -regulada por *quorum sensing*- en el momento en el que se alcanza el tamaño óptimo desde un punto de vista fisiológico (Fuqua et al, 1994).

La matriz del biofilm está compuesta fundamentalmente por material polimérico sintetizado por las bacterias que lo constituyen, aunque también puede contener proteínas, ácidos nucleicos, restos de plaquetas, sales minerales, fibrina y calcio. Su importancia radica no sólo en que proporciona integridad estructural, sino que también es activa biológicamente, pudiendo retener nutrientes, agua y determinadas enzimas (Marsh, 2005), y desempeña un papel primordial

en términos de resistencia a agresiones externas (Marsh, 2004). Generalmente está compuesta por exopolisacáridos, proteínas o ambos. Los exopolisacáridos son fundamentales para el desarrollo del biofilm, ya que las bacterias los utilizan para adherirse, por lo que de ellos depende la integridad de todo el conjunto (Costerton y Lewandowski, 1997; Socransky y Haffajee, 2002). A medida que el biofilm madura, hay una síntesis continua de exopolímeros, que posteriormente serán los encargados de conformar la matriz (Marsh, 2005). Paradójicamente, los polisacáridos también pueden condicionar las alteraciones del biofilm y participar en su desaparición, ya que ambas situaciones pueden estar ocasionadas por alteraciones o pérdidas de estos componentes de la matriz (Socransky y Haffajee, 2002). Los exopolisacáridos exhiben otras importantes funciones en el marco del biofilm (Serrano-Granger y Herrera, 2005):

1. Nutrición

Además de tener la capacidad de atrapar nutrientes del medio y de brindárselos a distintas especies dentro del biofilm, algunos exopolisacáridos producidos por determinadas bacterias también sirven directamente de nutrientes para otras microcolonias.

2. Retirada de desechos

Favorecen el desarrollo bacteriano eliminando desechos del medio.

3. Adhesión

La capacidad de adhesión de los exopolisacáridos favorece a su vez la adhesión de las bacterias a distintas superficies.

4. Protección

Protegen a las bacterias evitando su desecación y limitando la acción de los agentes antimicrobianos.

Los canales y poros, al igual que en otros biofilms naturales, se han descrito en la placa dental, y por lo tanto constituyen una parte integral de su estructura (Wood *et al*, 2000; Zaura-Arite *et al*, 2001). Estos canales suelen estar tapizados por material celular muerto y rodeados a su vez por microorganismos vivos, lo que significaría que éstos últimos tienen acceso directo a los nutrientes que difunden a través de dichos canales (Socransky y Haffajee, 2002), y además están protegidos de la acción directa antibacteriana del ambiente (Auschill *et al*, 2001). La mayor fuente de los nutrientes que difunden por los canales del biofilm y que sirven de alimento a las bacterias orales son los sustratos endógenos, derivados de la saliva y del fluido crevicular (Beighton *et al*, 1986). Los canales se consideran el primer nivel en términos de entrada de nutrientes, salida de desechos celulares y penetración de agentes antimicrobianos. El proceso predominante para el transporte de solutos en el interior de los grupos bacterianos es la difusión simple (Stewart, 2003). Los poros y los conductos más pequeños que abastecen los agregados celulares pueden estar ocupados por exopolisacáridos y representan el segundo nivel. Estos conductos no tienen por qué estar necesariamente conectados con los canales de agua. En el tercer nivel, los agregados celulares y los exopolisacáridos asociados pueden incluso dificultar la difusión (Costerton *et al*, 1995).

Existe una relación fundamental entre la estructura del biofilm y su función *in situ* (Costerton *et al*, 1995). La estructura y el comportamiento regulan la aparición de patología, por lo que el desarrollo de terapias efectivas dependerá directamente de la propia arquitectura del biofilm. Los microorganismos que forman parte de un biofilm, además de establecer un contacto por proximidad física, también establecen una cooperación en el ámbito fisiológico, facilitando la transferencia de sustratos de un microorganismo a otro y la cooperación metabólica (Wolfaardt *et al*, 1994). Como consecuencia, los biofilms presentan una

gran resistencia a los antibacterianos orales, mucho mayor que la que ostentan las bacterias planctónicas (Wilson, 1996; Gilbert et al, 1997).

1.2.4. Propiedades

Resistencia a antimicrobianos

La reducida susceptibilidad de las bacterias del biofilm a los agentes antimicrobianos en comparación con sus equivalentes planctónicas es, sin lugar a dudas, la propiedad más relevante y característica de muchos biofilms naturales (Larsen y Fiehn, 1996; Wilson, 1996; Gilbert et al, 1997; Wood et al, 2000; Fine et al, 2001; Auschill et al, 2001; Mah y O'Toole, 2001), incluida la placa dental (Marsh y Bradshaw, 1993; Kinniment et al, 1996b; Pratten y Wilson, 1999). Aunque se ha sugerido que esta diferencia en la resistencia antimicrobiana es consecuencia tanto de la organización estructural del biofilm como de su patrón alterado de expresión genética (Gilbert et al, 1997; 2002), se han barajado diversas hipótesis para explicar este fenómeno:

1. Estructura de los biofilms bacterianos

Las interacciones que existen entre los exopolisacáridos de la matriz, sus constituyentes y los antimicrobianos, comprometen la eficacia de éstos últimos (Gilbert et al, 1997). El comportamiento de las bacterias frente al antimicrobiano depende de otros muchos factores, como la densidad de las microcolonias o la relación entre células y matriz (Wood et al, 2000).

2. Capacidad de penetración de los agentes antimicrobianos

El conocimiento de la cinética del transporte de masas dentro de los biofilms es esencial para entender cómo adquieren su arquitectura característica, y para optimizar las estrategias que permitan su control y erradicación (Thurnheer et al, 2003). Se sabe que los polímeros de la matriz retardan la difusión de los antibióticos (Costerton et al, 1999) y que los solutos, en general, difunden a menor velocidad dentro de los

biofilms que en el agua (*Stewart, 1998*). Se ha sugerido que la copiosa matriz extracelular protege a las bacterias, impidiendo la penetración del agente antimicrobiano mediante interacciones iónicas o por reacciones químicas entre el polímero y el agente. El proceso de interacciones iónicas recibe el nombre de teoría de la difusión-reacción y obedece a que la matriz está cargada negativamente, mientras que el agente antimicrobiano lo está positivamente. La difusión de nutrientes y gases a través del biofilm es determinante en la fisiología de las bacterias adheridas (*Rozen et al, 2001*). Se ha demostrado que un coeficiente de difusión bajo origina condiciones de estrés en el biofilm, disminuyendo el crecimiento bacteriano y dando como resultado un biofilm con menos potencial en la formación de caries. En este sentido, se ha especulado que el agente se uniría a los microorganismos de la superficie del biofilm e inhibiría su crecimiento y proliferación, sin afectar a las células de las zonas más profundas (*Marsh, 2005*). También es importante tener en cuenta la composición química de la matriz, así como las propiedades físico-químicas del agente antimicrobiano, aunque esta hipótesis ha sido desplazada por la de las “diferencias fenotípicas”, que comentaremos más adelante.

3. Ritmo de crecimiento de las bacterias que forman el biofilm

Según Brown et al (*Brown et al, 1988*), los biofilms tienen un ritmo de crecimiento muy lento, presumiblemente debido al microambiente del propio biofilm, consecuencia de la gran densidad celular. Se ha señalado que las bacterias que crecen despacio o que no crecen, son poco susceptibles a muchos agentes antimicrobianos (*Costerton et al, 1999*).

4. Edad del biofilm

Existen trabajos en los que la edad del biofilm también se considera un factor que proporciona resistencia a los agentes antimicrobianos. En este sentido, Millward y Wilson (*Millward y Wilson, 1989*) demostraron

que los biofilms maduros (72 h) eran más resistentes a la acción de la clorhexidina que los más jóvenes (24 h).

5. Influencia de los factores medioambientales sobre el agente antimicrobiano

Se ha planteado que la matriz podría atrapar enzimas neutralizadoras que inactivan antibióticos -como las β -lactamasas-, con lo que aumentaría su concentración local y se reduciría la susceptibilidad de las bacterias planctónicas. Además, se ha insinuado que el microambiente de las profundidades del biofilm podría no ser favorable a la acción de determinados fármacos (*Gilbert et al, 2002*).

6. Expresión genética alterada de los biofilms

Las bacterias que crecen formando parte de un biofilm, presentan un fenotipo más resistente frente a los antimicrobianos -ya sea como resultado del contacto directo con una superficie o como respuesta a la heterogeneidad del ambiente local-, y esta resistencia se mantiene incluso cuando se desprenden del biofilm (*Socransky y Haffajee, 2002*). Dada la trascendencia de esta característica, se desarrolla más detalladamente a continuación.

Expresión genética alterada de los biofilms

Una célula bacteriana planctónica de un cultivo puro monoespecie es fenotípicamente muy diferente de una bacteria con el mismo genotipo que crece en un biofilm, como también serán muy diferentes sus actividades metabólicas, sus propiedades de adhesión y su sensibilidad a los agentes antibacterianos (*Costerton y Lewandowski, 1997*).

Costerton et al y Gilbert et al (*Costerton et al, 1995; Gilbert et al, 1997*) confirmaron que las bacterias son capaces de intuir la presencia de una superficie a la que unirse y, como consecuencia ello, activan genes/operones que le confieren un fenotipo específico de adhesión. En

ese momento, la división celular y la síntesis de exopolisacáridos promueven el desarrollo de microcolonias anexas a un limo denso y adheridas a la superficie colonizada (*Gilbert et al, 1997*).

La inducción o la contención de la expresión genética en los microorganismos que constituyen un biofilm, así como la transferencia de genes resistentes, pueden dar lugar a un fenotipo menos susceptible frente a un determinado agente antimicrobiano (*Wilson, 1996; Marsh, 2005*). En la actualidad éste se considera el principal factor de resistencia a los antimicrobianos (*Costerton y Lewandowski, 1997*). La plasticidad en la estructura y la fisiología de las bacterias les permite llevar a cabo respuestas fenotípicas muy rápidas, no sólo cuando se altera la disponibilidad de nutrientes o su ritmo de crecimiento, sino también ante cambios de temperatura, pH y sucesivas exposiciones a concentraciones no efectivas de antibióticos. Estas respuestas pueden incluir modificaciones en algunos componentes celulares (incluyendo proteínas o fosfolípidos asociados a la membrana celular), y en la producción de enzimas extracelulares y polisacáridos (*Gilbert et al, 1997*).

Comunicación entre bacterias

La comunicación entre microorganismos es esencial para iniciar la colonización y posterior formación del biofilm sobre las superficies del esmalte dentario y la mucosa oral (*Kolenbrander et al, 2002*). En el caso de la placa dental, la diversidad existente en la microflora oral y la capacidad que tienen las bacterias de interactuar entre ellas, confirma la propuesta de que las bacterias orales no existen como entidades independientes, sino que funcionan de forma coordinada, organizadas espacialmente e integradas en una comunidad microbiana (*Marsh y Bradshaw, 1999*). Las bacterias que conforman un biofilm se comunican entre sí, bien por medio de señales químicas -transducción de estímulos- sintetizadas y secretadas por ellas mismas (*Jayaraman y*

Wood, 2008) o bien intercambiando material genético -mediante la transferencia horizontal de genes- (Marsh, 2005).

Los sistemas de transducción de estímulos promueven, mediante la acumulación de determinados compuestos de señalización, reacciones en cascada que inducen o inhiben la transcripción de genes, regulando la expresión genética de forma coordinada (Scheie y Petersen, 2004; Serrano-Granger y Herrera, 2005). Como consecuencia de esta comunicación interespecies y de la expresión genética, la organización espacial va cambiando con el tiempo (Kolenbrander et al, 2002). Los principales representantes de este mecanismo de transducción son el sistema de dos componentes y el *quorum sensing*.

En el sistema de dos componentes, el estímulo externo es detectado por el receptor transmembrana histidín-quinasa, que posteriormente cataliza una autofosforilación intracelular ATP-dependiente. El resultado final es la activación o la inhibición de genes (Scheie y Petersen, 2004). Se ha constatado su existencia en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, desempeña un papel importante en la transducción de estímulos y actúa como un sensor fundamental para la adaptación al entorno biológico del biofilm.

En el *quorum sensing* la comunicación entre bacterias se lleva a cabo a través de la difusión de pequeñas moléculas-señal denominadas autoinductores (Marsh, 2004) (Figura 5), que generalmente son altamente específicas (Scheie y Petersen, 2004). Su concentración está condicionada por la densidad celular, ya que la percepción de la señal ocurre a una concentración umbral (Kolenbrander et al, 2002). Cuando hay pocas células la producción de moléculas de señalización es escasa, pero cuando aumenta la densidad celular también se incrementa la autoinducción (Scheie y Petersen, 2004). En el momento en el que las moléculas-señal alcanzan el nivel umbral, se activa la

expresión genética (Socransky y Haffajee, 2002). Este sistema de comunicación facilita la adaptación de los microorganismos (Gram-positivos y Gram-negativos) ante el estrés ambiental (Marsh, 2004), hace que las bacterias optimicen sus factores de virulencia, prolonguen su supervivencia y estimulen su propagación (ten Cate, 2006; Jayaraman y Wood, 2008).

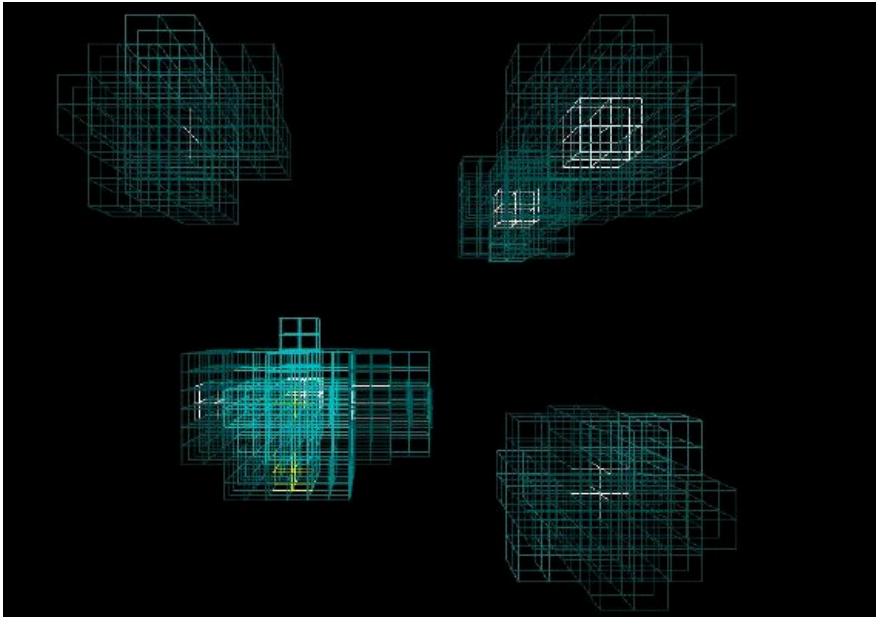


Figura 5. Modelo virtual tridimensional del *quorum sensing* bacteriano. Tomado del Departamento de Ciencia Computarizada de la Universidad de Sheffield <http://staffwww.dcs.shef.ac.uk/people/D.Romano/research.html#Maria>.

Los representantes más genuinos de estas moléculas autoinductoras son el péptido estimulador de la competencia (*Competence-Stimulating Peptide*; CSP) y el autoinductor-2. Muchos *Streptococcus* orales y algunos patógenos periodontales se comunican por medio del *quorum sensing* (Scheie y Petersen, 2004). En el caso concreto del *Streptococcus mutans* el *quorum sensing* está mediado por el CSP, y se ha demostrado que su frecuencia de transformación en el biofilm es entre 10 y 600 veces mayor que la de las células planctónicas

(Li et al, 2001). El CSP, además de inducir la competencia genética, está directamente relacionado con la formación del biofilm (Li et al, 2002a) y con la tolerancia al pH ácido, promoviendo una respuesta coordinada y protectora contra ese estrés potencialmente letal (Li et al, 2002b). El autoinductor-2 se ha señalado que es un mediador interespecies, que actúa fundamentalmente en comunidades mixtas (Bassler, 1999; Kolenbrander et al, 2002; Scheie y Petersen, 2004). Es producido por bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Scheie y Petersen, 2004), incluyendo entre otras *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* y *Fusobacterium nucleatum* (Frias et al, 2001).

La placa dental puede funcionar como un “reservorio genotípico” que alberga elementos móviles transferibles y genes (Marsh, 2005). La inactivación de un gen implicado en la formación de comunidades mixtas puede provocar una variación sutil en el fenotipo de un organismo, pero sólo durante las transiciones críticas en la composición de la población y no antes o después de éstas (Kolenbrander et al, 2002). La velocidad de transferencia de genes aumenta considerablemente en las comunidades de biofilms, aunque en la transferencia de material genético también participan otros mecanismos como los de difusión-reacción, neutralización-inactivación y fenotipos novedosos, que contribuyen a aumentar la resistencia antimicrobiana (Marsh, 2004).

Heterogeneidad fisiológica

La mayor parte de los biofilms contienen múltiples especies que ocupan micronichos separados por distancias muy pequeñas, entre los que existe un amplio rango de interacciones físicas, metabólicas y moleculares. Estas interacciones son fundamentales para la adhesión, crecimiento y supervivencia de determinadas especies en localizaciones concretas, permitiendo a los microorganismos sobrevivir en ambientes hostiles. La heterogeneidad ambiental permite que coexistan en la placa

dental microorganismos que serían incompatibles en un ambiente más homogéneo (Marsh, 2004). También se ha confirmado que hay distintos nichos químicos a diferentes profundidades del biofilm, lo que justificaría que microorganismos metabólicamente muy heterogéneos puedan coexistir en el interior de un mismo biofilm (Stewart, 2003). Este estilo de vida en comunidad, explica que puedan persistir en el biofilm bacterias con requerimientos metabólicos contradictorios, y además proporciona otras ventajas entre las que se incluyen (Marsh, 2005):

1. Hábitat amplio para el crecimiento

El metabolismo de los colonizadores primarios altera el ambiente local, favoreciendo la adhesión y el crecimiento de las especies que se incorporarán con posterioridad, potenciando así la diversidad de la microflora. Un claro ejemplo de esta situación es que especies consumidoras de oxígeno, como *Neisseria* spp., crean unas condiciones ambientales adecuadas para la colonización de anaerobios estrictos (Bradshaw et al, 1996a). De forma similar, la heterogeneidad del biofilm en cuanto al pH, tensión de oxígeno y otras características microambientales, permite que coexistan especies con un rango muy amplio de necesidades para su crecimiento.

2. Mayor diversidad y eficacia metabólicas

Determinadas macromoléculas complejas del huésped sólo pueden ser degradadas adecuadamente por asociaciones de bacterias (Bradshaw et al, 1994).

3. Mayor resistencia al estrés ambiental, los antimicrobianos y las defensas del huésped

Por ejemplo, un microorganismo sensible a un determinado antibiótico podría parecer aparentemente resistente, si sus bacterias vecinas produjeran un neutralizador; a este fenómeno se le denomina “patogenicidad indirecta” (Marsh, 2005).

4. Mayor potencial patogénico

En determinadas fases del proceso de enfermedad se requiere un repertorio variado de rasgos virulentos y cada uno de ellos precisa de la acción conjunta de un grupo de bacterias que interactúan entre sí; este proceso recibe el nombre de “sinergismo patogénico” (*van Steenberg et al, 1984*).

Esta heterogeneidad ambiental permite que convivan microorganismos que resultan incompatibles en un ambiente más homogéneo, y explica cómo bacterias que aparentemente tienen necesidades metabólicas y de crecimiento opuestas, son capaces de coexistir y perdurar en el mismo nicho ecológico. La heterogeneidad fisiológica generada en el interior del biofilm también favorece la diversidad genotípica y fenotípica, que proporciona una especie de “seguro biológico” para proteger a la comunidad microbiana en condiciones adversas (*Marsh, 2005*). Gracias a esta heterogeneidad, células de la misma especie microbiana pueden mostrar estados fisiológicos extremadamente distintos, aunque estén separadas por distancias tan pequeñas como 10 μm (*Socransky y Haffajee, 2002*).

Capacidad adaptativa

En condiciones favorables, el biofilm conserva un equilibrio entre el mantenimiento de su estructura y su crecimiento (*Serrano-Granger y Herrera, 2005*), aunque ello implica una gran capacidad de adaptación morfológica y fisiológica como respuesta a los cambios ambientales. Diferentes gradientes químicos, de nutrientes y de oxígeno, crean microambientes a los que los microorganismos tienen que adaptarse para sobrevivir. La forma que tienen de hacerlo es regulando un gran número de genes, lo que permite optimizar sus propiedades fenotípicas en el ambiente existente (*Scheie y Petersen, 2004*).

Las asociaciones de bacterias para formar biofilms se efectúan cuando éstas se encuentran en una “buena situación”, aunque sea relativa, ya que generalmente viven circunstancias de limitación de nutrientes y aletargadas. En hábitats extremos, cuando hay un déficit de nutrientes significativo, las bacterias empaquetan su ADN, cesan sus actividades metabólicas y llegan a disminuir su tamaño hasta dos tercios, siendo capaces de permanecer en este estado de latencia durante años, décadas o incluso siglos. Esto explicaría por qué los antimicrobianos son menos efectivos clínicamente de lo que pudiera esperarse, en base a los resultados obtenidos en el laboratorio con bacterias metabólicamente activas (*ten Cate, 2006*). Cuando estas bacterias encuentran una nueva fuente de alimento, desempaquetan su ADN, reactivan sus genes y reanudan su estilo de vida en comunidad (*Slavkin, 1997*).

1.3. MODELOS DE ESTUDIO *IN VITRO* DEL BIOFILM ORAL

Las propuestas experimentales para analizar comunidades orales complejas como la placa dental, habitualmente comienzan con estudios *in vitro* y modelos simples. Estos modelos de crecimiento de biofilm *in vitro* creados en el laboratorio, pueden ayudar a entender su estructura y función (*Kinniment et al, 1996a*). También pueden emplearse para analizar el efecto de diversos agentes antimicrobianos, si bien suponen una simplificación del sistema y siempre va a existir cierto compromiso entre el ecosistema *in vivo* y estos modelos (*Frías y Alsina, 2001*). En los últimos años el desarrollo de diferentes modelos de biofilm *in vitro* ha supuesto un gran avance en el estudio y evaluación de agentes antiplaca (*Baehni y Takeuchi, 2003*). Es importante tener en cuenta que, para desarrollar nuevos antimicrobianos que tengan efecto en el complejo ambiente de la cavidad oral, es necesario tener un buen modelo que reproduzca las especies bacterianas, el sustrato y la fuente de nutrientes que están presentes *in vivo*. Además, para evaluar correctamente la efectividad antibacteriana y antiplaca del agente a

estudio es importante liberar el compuesto, de tal forma que los resultados sean comparables a los estudios clínicos (*Pratten et al, 1998b*). A continuación se detallan los modelos más utilizados en la literatura para generar biofilms *in vitro* (*Wilson, 1996*):

1. Crecimiento en placas de agar

Constituye uno de los modelos de biofilm más simples. Las bacterias crecen en una placa de agar. El resultado es una biopelícula que consiste en un acúmulo de células firmemente empaquetadas y embebidas en una matriz extracelular, pero que sólo es representativo de un biofilm formado en una interfase sólido-gas. Dadas sus limitaciones, esta técnica no ha sido muy utilizada para evaluar la susceptibilidad de las bacterias orales a los antimicrobianos convencionales.

2. Modelos basados en filtros de membrana

El crecimiento del microorganismo se produce en un filtro de membrana que está en contacto con una superficie de agar. Una vez que el biofilm se ha formado, puede ser extraído intacto y expuesto al agente antimicrobiano. Esta técnica se ha utilizado para evaluar la susceptibilidad de bacterias orales como *Streptococcus sanguinis* y *Porphyromona gingivalis* a antimicrobianos como clorhexidina (*Millward y Wilson, 1989; Wilson, 1996*).

3. Modelos basados en quimiostatos

Bradshaw et al (*Bradshaw et al, 1990*) utilizaron el quimiostato para crear comunidades estables de hasta 10 especies de bacterias orales, y posteriormente incluyeron discos de hidroxiapatita en el recipiente de cultivo para inducir la formación de biofilms multiespecies (*Marsh y Bradshaw, 1993*).

4. El fermentador de biofilm de profundidad constante (*Constant Depth Film Fermentor*, CDFF)

El CDFF (Figura 6), desarrollado por Peters y Wimpenny (*Peters y Wimpenny, 1988*), es uno de los métodos más utilizados *in vitro* para generar biofilms reproducibles que imitan la placa dental. Está constituido básicamente por un recipiente de vidrio con un sistema de placas de acero inoxidable, que sirven de soporte a 15 pocillos que incorporan 6 agujeros cilíndricos cada uno, con unos tapones de politetrafluoroetileno sobre los que se forma el biofilm. Los tapones también pueden incorporar discos de hidroxiapatita o de esmalte, lo que permite la formación de biofilms sobre diferentes sustratos. Las placas pueden recogerse asépticamente en el transcurso de un experimento para exponerlas a agentes antimicrobianos, aunque también se puede liberar el agente directamente en el circuito del CDFF.

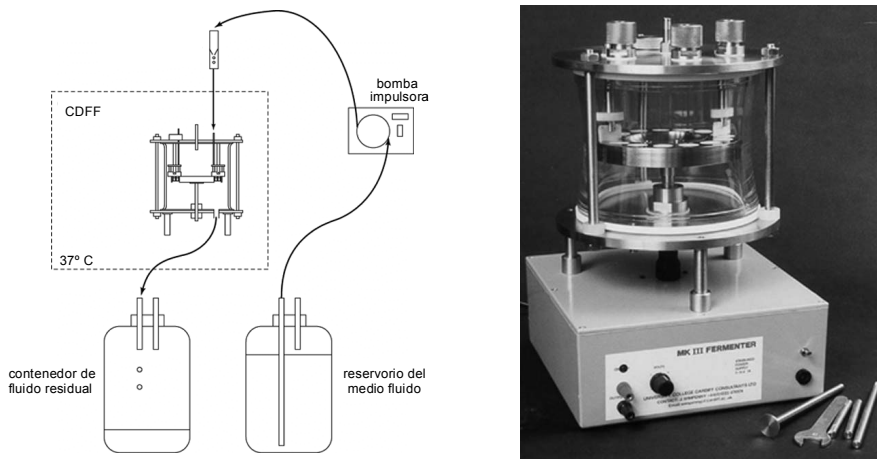


Figura 6. Fermentador de biofilm de profundidad constante (*Constant Depth Film Fermentor*, CDFF). *Izquierda:* esquema del circuito de circulación continua. *Derecha:* imagen de la incubadora. Modificado de Pratten J. *Curr Protoc Microbiol* 2007.

Este modelo es muy apropiado para estudiar biofilms de bacterias orales, porque proporciona un ambiente similar al que existe en la cavidad oral. Otras ventajas destacables del sistema son las siguientes:

- Proporciona muchas copias, muchos biofilms idénticos (hasta 90) en la misma serie.
- Se pueden incorporar de forma intermitente nutrientes o agentes antimicrobianos.
- Permite tomar muestras del biofilm en distintos momentos a lo largo de una serie.
- Como inóculo pueden utilizarse cultivos mixtos o puros, o muestras de placa homogeneizada.
- El sistema es autoclavable y permite controlar la temperatura.
- Pueden estudiarse diferentes sustratos como hidroxiapatita o esmalte.
- Es aplicable para estudiar el efecto de un pretratamiento del sustrato con agentes antimicrobianos, en la posterior formación del biofilm.

Desde que se demostró que el CDFF podía producir biofilms estables (*Kinniment, 1996a*), ha sido empleado por numerosos investigadores para realizar estudios sobre el biofilm oral (*Pratten y Wilson, 1999; Wilson, 1999; Pratten et al, 2000; Hope et al, 2002; Hope y Wilson, 2003; Hope y Wilson, 2006; Pratten, 2007*), para evaluar la susceptibilidad de determinadas bacterias orales frente a antisépticos (*Wilson et al, 1996*), e incluso para generar biofilms multiespecies en condiciones similares a las de la placa dental, en términos de composición y de distribución espacial bacteriana (*Pratten et al, 1998a*).

5. Bocas artificiales

Las bocas artificiales permiten evaluar el crecimiento, metabolismo, patogenicidad y mineralización de la placa dental bajo condiciones muy controladas. También se emplean para analizar interacciones microbianas en la placa dental y en otros biofilms, y para monitorizar con gran precisión sus características físicas, químicas, biológicas y moleculares (*Tang et al, 2003*).

Para facilitar la revisión de los trabajos publicados sobre biofilms generados *in vitro*, los hemos diferenciado en dos grupos según el número de especies bacterianas que los componen: biofilms homogéneos (formados por una sola especie) y biofilms heterogéneos o multiespecies (formados por más de una especie).

1.3.1. Biofilms constituidos por una única especie bacteriana

Numerosos autores han empleado *Streptococcus sanguinis* (antes *sanguis*) para crear biofilms homogéneos, probablemente porque esta especie bacteriana representa un constituyente primordial de la placa supra- y subgingival (Millward y Wilson, 1989), además de ser uno de los colonizadores pioneros del diente humano (Decker et al, 2003).

En muchos de estos trabajos se ha comparado la susceptibilidad de las bacterias que forman un biofilm, con la que expresan las bacterias planctónicas que están en un grupo de cultivo o en suspensión. Así, Larsen y Fiehn (Larsen y Fiehn, 1996) compararon la susceptibilidad antimicrobiana de *S. sanguinis* en un biofilm y en un cultivo convencional, tras su exposición a clorhexidina, amoxicilina y doxiciclina. Para ello emplearon el aparato modificado de Robbins sobre discos de silicona, en un modelo de flujo continuo que imitaba el fluido ininterrumpido de la saliva y del líquido crevicular que bañan la superficie de los dientes (Larsen y Fiehn, 1995). Millward y Wilson (Millward y Wilson, 1989) compararon el efecto de la clorhexidina sobre biofilms creados en caldo de cultivo durante una noche, con su efecto sobre bacterias que estaban en suspensión. Además, calcularon las variaciones de la susceptibilidad a la clorhexidina en base a la edad del biofilm y al hecho de añadir sangre al medio. Decker et al (Decker et al, 2003) compararon la susceptibilidad a la clorhexidina de bacterias pioneras del biofilm y de bacterias planctónicas. El biofilm lo generaron en una cámara de flujo y la vitalidad bacteriana se evaluó utilizando la tinción de fluorescencia LIVE/DEAD® BacLight™. Además, en este

trabajo se testaron dos sustratos distintos sobre los que se depositaron las bacterias: esmalte y vidrio. Elliott et al (*Elliott et al, 2005*) también compararon dos sustratos diferentes, vidrio y vidrio recubierto de hidroxiapatita. La formación de los biofilms se llevó a cabo en un sistema de flujo celular. Dos años más tarde, el grupo de Decker publicó otro artículo en el que, utilizando una metodología similar a la de su trabajo anterior, compararon el efecto de la clorhexidina, del quitosán y de una combinación de ambos, sobre bacterias sésiles y planctónicas, aunque en esta ocasión sólo emplearon como sustrato el esmalte (*Decker et al, 2005*). En 2008, aplicando la misma metodología, analizaron el efecto de un enjuague con xilitol, formulado como solución pura o combinado con clorhexidina, sobre biofilms de *S. sanguinis* y de *S. mutans* (*Decker et al, 2008*).

Un número considerable de autores ha utilizado el fermentador de biofilm de profundidad constante (CDFF) para producir *in vitro* biofilms formados por *Streptococcus sanguinis*. Wilson et al (*Wilson et al, 1996*) analizaron con este sistema la viabilidad del *S. sanguinis* después de la aplicación de clorhexidina y cloruro de cetilpiridinio. También Pratten et al (*Pratten et al, 1998c*) aplicaron el CDFF en varios estudios. En uno de ellos evaluaron el efecto de tres colutorios antimicrobianos sobre la formación y la vitalidad del biofilm mediante el conteo de bacterias viables. Los biofilms se formaron sobre discos de hidroxiapatita, esmalte bovino y politetrafluoroetileno, lo que también les permitió analizar el efecto de distintos sustratos. El mismo grupo publicó otro artículo en el que compararon el efecto de la clorhexidina sobre la viabilidad y la formación de los biofilms, mediante la tinción LIVE/DEAD® BacLight™ y el conteo de colonias viables. En esta investigación, además de analizar biofilms de *S. sanguinis* creados en el CDFF, también examinaron microcosmos de placa dental multiespecie; a diferencia del trabajo anterior, en éste sólo utilizaron discos de esmalte bovino (*Pratten et al, 1998b*).

En 2005, Wirthlin et al (Wirthlin et al, 2005), tomando como guía las características del CDFF, diseñaron un nuevo prototipo ideado para crear biofilms y testar en ellos agentes antimicrobianos. A este aparato lo denominaron *laboratory model biofilm fermentor* (LMBF) y para validarlo llevaron a cabo un test preliminar que confirmó dos hipótesis: que el LMBF podía generar y conservar un biofilm oral de una especie - en este caso *S. sanguinis*-, y que permitía testar *in vitro* colutorios antisépticos.

No todos los trabajos publicados sobre producción de biofilms *in vitro* incorporan *S. sanguinis* y en algunos estudios se han empleado otras especies, como el *Streptococcus mutans*. Deng et al (Deng et al, 2004) crearon biofilms de *S. mutans* sobre sustratos de dentina bovina y de poliacrilato. El biofilm resultante, después de 15 días de crecimiento, fue irrigado con clorhexidina y a continuación cuantificaron la viabilidad bacteriana, la formación de ácido y el pH tras una sobrecarga de glucosa. Zanin et al (Zanin et al, 2005), por medio del CDFF, generaron biofilms sobre un sustrato de hidroxiapatita, para evaluar el efecto de la terapia fotodinámica en la viabilidad y la arquitectura del biofilm. Shemesh et al (Shemesh et al, 2007) crearon biofilms de 2 y 7 días con *S. mutans* sobre discos de dentina bovina y sobre membranas para cultivos tisulares, y utilizaron un escáner de ultrasonidos de alta frecuencia para examinar la morfología tridimensional del biofilm y para calcular su grosor. Rozen et al (Rozen et al, 2001) crearon biofilms de *S. mutans* y de *S. sobrinus*, ambos sobre un sustrato de hidroxiapatita cubierto de glucano y fructano. El objetivo de su trabajo era relacionar el perfil de crecimiento de las bacterias de estos biofilms con el grosor de los mismos y con la curva de crecimiento de las bacterias planctónicas. Para ello, calcularon las unidades formadoras de colonias iniciales, el grosor del biofilm en varios momentos y la viabilidad de las bacterias planctónicas. Thrower et al (Thrower et al, 1997) compararon el efecto de tres colutorios -clorhexidina, cloruro de cetilpiridinio y triclosán- sobre

el *Aggregatibacter* (antes *Actinobacillus*) *actinomycetemcomitans* en forma de biofilm de 1 y 3 días de evolución, y en forma de bacterias planctónicas. En 2001, Fine et al (*Fine et al, 2001*) publicaron un estudio con un diseño similar, pero los colutorios testados fueron aceites esenciales, fluoruro de estaño y triclosán. Eick et al (*Eick et al, 2004*) evaluaron la eficacia de 4 antibióticos diferentes frente a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Streptococcus constellatus* y *Porphyromonas gingivalis*, tanto integrados en biofilms (generados sobre un portaobjetos con saliva artificial) como en su forma planctónica. Para ello calcularon las unidades formadoras de colonias de cada uno de los portas y las concentraciones mínimas inhibitorias para las bacterias planctónicas. Más recientemente, van der Mei et al (*van der Mei et al, 2008*) utilizaron *Actinomyces naeslundii*, *S. mutans*, *S. sobrinus* y *S. oralis*, para determinar los efectos del fluoruro de amina sobre la adhesión bacteriana y el crecimiento del biofilm.

1.3.2. Biofilms constituidos por más de una especie bacteriana

Numerosos autores coinciden en que para poder predecir la interacción que ocurrirá *in vivo* entre las bacterias de la placa dental y un agente antimicrobiano, es imprescindible testarlos en biofilms multiespecies (*Larsen y Fiehn, 1996; Wilson, 1996; Pratten et al, 1998b*). En la metodología de buena parte de estos estudios se ha utilizado la tinción LIVE/DEAD® BacLight™ -que tiñe diferencialmente las bacterias vivas de las muertas-, el análisis con microscopio confocal o ambas técnicas simultáneamente.

Guggenheim et al (*Guggenheim et al, 2001a*) desarrollaron un modelo *in vitro* de placa supragingival de 5 especies bacterianas sobre discos de hidroxiapatita. El objetivo de su trabajo era demostrar la reproducibilidad de este modelo y su aplicación para la evaluación de antimicrobianos, concretamente clorhexidina y triclosán. Para ello utilizaron la tinción LIVE/DEAD® BacLight™ y la visualización con

microscopio confocal, además de técnicas de cultivo convencionales. Thurnheer et al (*Thurnheer et al, 2003*) crearon en 2003 un biofilm según el modelo descrito por Guggenheim, con la finalidad de examinar la difusión de diferentes macromoléculas. También estaba integrado por 5 especies bacterianas adheridas a discos de hidroxiapatita pero, a diferencia del anterior, en éste se añadió *Candida albicans* y se utilizó una tinción diferente (Syto13, Calcofluor y 10K-Dex). Con la ayuda del microscopio confocal, los autores investigaron la difusión y la penetración de distintos marcadores de fluorescencia, mediante el cálculo de los coeficientes de difusión y de la viscosidad.

Además de Thurnheer et al (*Thurnheer et al, 2003*), pocos autores han utilizado hongos, y más concretamente *Candida albicans*, para la formación de biofilms *in vitro*. Shapiro et al (*Shapiro et al, 2002*) crearon biofilms constituidos por 5 especies sobre discos de hidroxiapatita que, en muchos casos, incluían también *C. albicans*, y utilizaron este modelo de biofilm oral para testar hasta 12 colutorios diferentes. Por su parte, Lamfon et al (*Lamfon et al, 2005*) investigaron la composición de los biofilms creados *in vitro*, a partir de muestras de pacientes con estomatitis protética, y la susceptibilidad de los aislamientos de *C. albicans* a miconazol, fluconazol y clorhexidina.

Otro estudio en el que también se utilizó la tinción LIVE/DEAD® BacLight™ fue el publicado por Pratten et al (*Pratten et al, 1998a*), en el cual determinaron la composición y la susceptibilidad a la clorhexidina de biofilms compuestos por 6 especies bacterianas habituales de la placa dental supragingival, creados sobre discos de esmalte bovino con la ayuda del CDFF. La determinación de los microorganismos supervivientes se realizó por conteo en cultivos y, gracias a la tinción, pudo observarse la distribución de las bacterias vivas y muertas. En el mismo año, Wilson et al (*Wilson et al, 1998*) también evaluaron el efecto de la exposición a la clorhexidina, de microcosmos de placa dental

formados en el CDFF, en presencia y ausencia de sacarosa. El efecto se determinó mediante la cuantificación de las bacterias supervivientes. Un año después, los mismos autores, aplicando una metodología muy similar, evaluaron las consecuencias de la administración intermitente (2 veces al día) de gluconato de clorhexidina, confirmando que a los 4 días el conteo de anaerobios había recuperado los valores basales (previos a la administración del antiséptico) y que la composición bacteriana del biofilm había cambiado (*Pratten y Wilson, 1999*).

Algunos autores han centrado sus investigaciones en el análisis de la distribución espacial de la viabilidad bacteriana dentro de los biofilms. Guggenheim et al (*Guggenheim et al, 2001b*) determinaron la disposición espacial y la conducta de asociación de 5 especies bacterianas en un modelo de placa supragingival formado sobre discos de hidroxiapatita. Hope et al (*Hope et al, 2002*), utilizando el microscopio confocal y la tinción LIVE/DEAD® BacLight™, examinaron la disposición de las bacterias viables y no viables dentro de microcosmos de placa dental. Estos microcosmos fueron creados en el CDFF y estaban constituidos por 3 géneros bacterianos habituales en la placa supragingival. En 2003, el mismo grupo, después de comprobar que las protrusiones de un biofilm contenían predominantemente bacterias viables, se planteó medir el grosor de la capa más externa de bacterias viables de un biofilm creado en el CDFF sobre discos de hidroxiapatita (*Hope y Wilson, 2003*). Años más tarde, y continuando con esta línea de investigación, publicaron un nuevo trabajo en el que describieron una metodología para crear biofilms orales en condiciones similares a las existentes en la bolsa periodontal. Para ello, emplearon de nuevo el CDFF, pero esta vez con un inóculo de placa subgingival sobre discos de hidroxiapatita; en este estudio analizaron el desarrollo de la estructura del biofilm y la distribución espacial de la vitalidad celular (*Hope y Wilson, 2006*). Hope y Wilson (*Hope y Wilson, 2004*), utilizando el CDFF para el crecimiento de microcosmos de placa dental sobre

discos de hidroxiapatita, analizaron el efecto de la clorhexidina sobre estos biofilms y los cambios que ésta producía en los perfiles de viabilidad. Posteriormente, Filoche et al (*Filoche et al, 2007*) también cuantificaron la biomasa total viable de los microcosmos de la placa, evaluados bajo distintas condiciones de crecimiento (con suplementos de sacarosa y caseína) y tratados con diferentes antisépticos (clorhexidina, aceites esenciales y fluoruro). En este caso los biofilms se generaron en una boca artificial, que posteriormente fue instalada en una cámara de crecimiento, y los sustratos utilizados fueron esmalte y Thermanox™.

Otros autores han aplicado tanto la microscopía confocal como la tinción LIVE/DEAD® BacLight™ con objetivos de investigación diferentes (*Bradshaw et al, 1996b; Wood et al, 1999; Pratten et al, 2000; Bradshaw et al, 2002; Foster y Kolenbrander, 2004; Rolland et al, 2006; Takenaka et al, 2008*). Wood et al (*Wood et al, 1999*) se sirvieron del microscopio confocal para evaluar el efecto de la terapia fotodinámica sobre un biofilm desarrollado sobre discos de esmalte de 7 días de evolución. Bradshaw et al (*Bradshaw et al, 1996b*), modificaron el sistema de quimiostatos para poder incorporar superficies rugosas y removibles sobre las que se pudiesen formar los biofilms. En un experimento preliminar, analizaron el efecto de pulverizaciones repetidas de glucosa y de la acidificación del pH, en biofilms compuestos por 10 especies bacterianas y en la comunidad planctónica correspondiente. Utilizando el microscopio electrónico de barrido y el microscopio confocal, evaluaron la profundidad y la estructura del biofilm. Los mismos autores publicaron otro trabajo en 2002, en el que compararon el efecto de bajas concentraciones de fluoruro en biofilms y en comunidades microbianas planctónicas (*Bradshaw et al, 2002*). Pratten et al (*Pratten et al, 2000*), empleando el microscopio confocal, investigaron la estructura de biofilms orales intactos, formados en el CDFF sobre discos de esmalte embebidos en saliva artificial con y sin

suplementos de sacarosa. Foster y Kolenbrander (*Foster y Kolenbrander, 2004*), utilizaron un flujo celular acondicionado con saliva para examinar el desarrollo de biofilms a partir de un inóculo de 4 especies bacterianas. Analizaron las muestras con microscopio confocal, emplearon varias tinciones (entre ellas BacLight) y además determinaron la composición del biofilm con FISH (hibridación *in situ* fluorescente). Rolland et al (*Rolland et al, 2006*) plantearon la hipótesis de que la adhesión de una resina con propiedades antibacterianas a la superficie de la dentina podría reducir la formación del biofilm. Para comprobarlo crearon biofilms en un pool de saliva natural sobre dentina recubierta de resina adhesiva y, una vez más, emplearon la tinción LIVE/DEAD® BacLight™ y el microscopio confocal. Takenaka et al (*Takenaka et al, 2008*) también utilizaron esta técnica para describir los patrones espaciales y temporales de la actividad de un colutorio en modelos de biofilm oral.

Al igual que en el trabajo citado previamente de Pratten et al (*Pratten et al, 2000*), el CDFE también fue empleado por otros investigadores. Kinniment et al (*Kinniment et al, 1996a*) recurrieron a esta técnica para generar un biofilm compuesto por 9 especies bacterianas, que creció en un quimiostato hasta alcanzar un estado estable, siendo entonces analizado con microscopio electrónico de barrido. En otra investigación efectuada por este mismo grupo, se aplicó este mismo protocolo para evaluar la actividad de agentes antimicrobianos, concretamente la clorhexidina (*Kinniment et al, 1996b*).

En 2007, se publicaron sendos artículos en los que se desarrollaba un modelo de biofilm que imitaba la placa subgingival. Walker y Sedlacek (*Walker y Sedlacek, 2007*) lo produjeron sobre discos de hidroxiapatita insertados en placas de cultivo e inoculados con alícuotas de placa subgingival dispersa, alcanzando un estado estable tras 10 días de crecimiento. Los mismos autores utilizaron ese modelo

de biofilm de placa subgingival para investigar su resistencia a antibióticos de uso común (Sedlacek y Walker, 2007).

Para completar este apartado, mencionaremos otros artículos sobre la formación de biofilms multiespecies *in vitro*, pero cuyos objetivos difieren de los trabajos descritos hasta el momento. Landa et al (Landa et al, 1997), valiéndose de una cámara de flujo, generaron un biofilm compuesto por 6 especies bacterianas sobre discos de esmalte bovino bañados en saliva, para evaluar cómo la aplicación de diferentes colutorios y de un enjuague precepillado, condicionaban la adhesión a la superficie del esmalte de un grupo de colonizadores pioneros. Dos años más tarde, Helmerhorst et al (Helmerhorst et al, 1999) investigaron la eficacia de varios péptidos antimicrobianos salivales frente a las bacterias de biofilms multiespecies -constituidos por 7 especies bacterianas-, y compararon su efecto con el producido por la clorhexidina. El grupo liderado por Roberts, creó un biofilm integrado por 2 especies, para cuantificar su crecimiento y determinar la concentración mínima inhibitoria de clorhexidina; además, evaluaron microscópicamente las propiedades morfológicas del biofilm creado (Roberts et al, 2002). Por último, Finney et al (Finney et al, 2003) produjeron un modelo de biofilm de 10 especies, sobre el que compararon la eficacia antimicrobiana de un nuevo compuesto fluorado que contenía triclosán y citrato de zinc frente a una pasta fluorada convencional.

1.3.3. Limitaciones de los modelos *in vitro* e *in vivo* desestructurado

El desarrollo de modelos de biofilm *in vitro* comportó avances significativos en el estudio de los biofilms orales (Jefferson y Cerca, 2006; Kolenbrander et al, 2006; McBain, 2009; Nobbs et al, 2009; Palmer, 2010). Sin embargo, como hemos señalado, estos modelos suelen involucrar un número limitado de especies y, además, se

generan bajo condiciones que no reflejan fidedignamente la situación fisiológica de la boca (Wecke *et al*, 2000; Auschill *et al*, 2004; Auschill *et al*, 2005; Watson *et al*, 2005). Algunos factores como la velocidad de renovación de la saliva, la capacidad de las sustancias antibacterianas de adherirse a la placa dental o a la superficie de los tejidos blandos y la interacción con las bacterias no cultivables, no pueden reproducirse en los experimentos *in vitro* (Al-Ahmad *et al*, 2007). En la actualidad, la comunidad científica reconoce que los modelos *in vitro* no pueden garantizar la creación de biofilms orales cuya composición y estructura sean comparables a las de aquéllos que se forman *in vivo* (Auschill *et al*, 2004; Auschill *et al*, 2005; Watson *et al*, 2005). Por este motivo, algunos autores consideran que los resultados obtenidos en los estudios *in vitro* deberían ser interpretados con cautela (Auschill *et al*, 2004; Al-Ahmad *et al*, 2007; Hannig y Hannig, 2009) y subrayan la necesidad de desarrollar modelos de biofilm *in vivo* que puedan ser posteriormente analizados intactos *ex vivo* (Costerton *et al*, 1999; Palmer *et al*, 2001; Auschill *et al*, 2004; Hannig y Hannig, 2009).

Muchos autores han utilizado placas de cultivo convencionales para analizar *in vivo* la composición de la placa dental y la actividad antimicrobiana de diferentes agentes, como la clorhexidina (Rosin *et al*, 2001; Daneshmand *et al*, 2002; Rosin *et al*, 2002; Sreenivasan *et al*, 2004). Sin embargo, las desventajas de estos métodos microbiológicos de cultivo son numerosas y bien conocidas (Al-Ahmad *et al*, 2007; Tomás *et al*, 2009). Las técnicas de fluorescencia también se han utilizado para analizar *in vivo* la composición de la placa dental y el efecto antibacteriano de algunos antisépticos (König *et al*, 2002; Arweiler *et al*, 2006; van der Mei *et al*, 2006; Al-Ahmad *et al*, 2010). Una característica metodológica común a todos estos estudios es que la evaluación de la placa bacteriana supragingival se lleva a cabo sobre material previamente extraído de la superficie del diente (König *et al*, 2002; Arweiler *et al*, 2006; van der Mei *et al*, 2006; Al-Ahmad *et al*,

2010), mientras que la placa bacteriana subgingival se obtiene utilizando puntas de papel o mediante el desbridamiento mecánico (*Daneshmand et al, 2002; Loivukene et al, 2005*), lo que probablemente interrumpa la delicada relación tridimensional existente entre las células, la matriz extracelular y el sustrato (*Wecke et al, 2000; Wood et al, 2000; Dige et al, 2009a*). Otra desventaja de este tipo de estudios es que el nivel de penetración de un agente antimicrobiano en las muestras de placa no puede ser evaluado, ya que las muestras están dispersas para su análisis (*van der Mei et al, 2006*). Por lo tanto, esta metodología proporciona un análisis inadecuado de la arquitectura y de la organización *in vivo* de la placa dental, así como de la acción de los agentes antimicrobianos sobre su estructura (*Arweiler et al, 2004; Watson et al, 2005*).

1.4. MODELOS DE ESTUDIO *IN VIVO* DEL BIOFILM ORAL

1.4.1. Aparatos removibles y sustratos para recoger biofilm de placa dental

Como hemos señalado, los biofilms orales formados sobre las superficies mucosas son diferentes a los que asientan sobre los tejidos duros, y la composición de la placa dental supragingival difiere de la subgingival (*Palmer et al, 2001*), por lo que estos factores deben tenerse en cuenta al diseñar sistemas de recogida de biofilm *in vivo*. La mayoría de los estudios *in vivo* sobre placa dental no-desestructurada, no emplean para su recogida dientes naturales, sino discos de diferentes materiales que se introducen en la boca durante un período de tiempo variable, para exponerlos a las condiciones intraorales de cada individuo. Por lo tanto, no se trata de placa dental propiamente dicha, sino de un biofilm presumiblemente muy parecido a la placa dental, que se genera en condiciones similares y que asienta sobre un sustrato generalmente artificial, por lo que en lo sucesivo lo denominaremos biofilm de placa dental (B-PD).

Debido a la importante variabilidad interpersonal detectada en las características del propio B-PD, en la mayoría de los estudios publicados hasta la fecha sobre su recogida mediante aparatos intraorales removibles, el número de participantes osciló entre 3 y 10 (*Auschill et al, 2002; Arweiler et al, 2004; Diaz et al, 2006; Dige et al, 2007; Dige et al, 2009b; Jung et al, 2010*). Sin embargo, algunos autores como Chalmers et al (*Chalmers et al, 2007*) y von Ohle (*von Ohle et al, 2010*) incluyeron únicamente 1 participante, mientras que otros como Al-Ahmad et al (*Al-Ahmad et al, 2007*) y Arweiler et al (*Arweiler et al, 2008*) incluyeron 27 y 24 voluntarios, respectivamente.

Wood et al (*Wood et al, 1999; Wood et al, 2000*), Watson et al (*Watson et al, 2005*) y Robinson et al (*Robinson et al, 2006*) utilizaron el “Leeds *in situ* device” para recoger placa dental supragingival. Este aparato removable consta de un anillo de nailon que incorpora un sustrato de esmalte -tal y como describieron previamente Robinson et al (*Robinson et al, 1997*)- sobre el cual crece el B-PD. Estos anillos se adhieren a las superficies vestibulares de los primeros o segundos molares superiores por medio de una resina compuesta, proporcionando un lugar de estancamiento para la formación del B-PD (*Robinson et al, 1997*). El grupo de investigación dirigido por Palmer (*Palmer et al, 2003; Diaz et al, 2006; Palmer et al, 2006; Chalmers et al, 2007*) diseñó unos muelles mandibulares bilaterales, que abarcan las superficies vestibulares desde el primer premolar hasta el primer molar y contienen varios discos. Numerosos autores han utilizado diferentes tipos de férulas de acrílico individualizadas para la formación y posterior recogida del B-PD (*Arweiler et al, 2004; Auschill et al, 2001; Auschill et al, 2004; Auschill et al, 2005; Al-Ahmad et al, 2007; Arweiler et al, 2008*).

En los estudios publicados sobre B-PD se han utilizado un gran número de sustratos sólidos de diferentes características, incluyendo esmalte humano (*Netuschil et al, 1998; Wood et al, 2000, Auschill et al,*

2001; Palmer et al, 2003; Chalmers et al, 2007), esmalte bovino (Al-Ahmad et al, 2007; Arweiler et al, 2008; Jung et al, 2010), dentina bovina (Zaura-Arite et al, 2001; Jung et al, 2010), hidroxiapatita (Gu et al, 2005) y vidrio pulido (Netuschil et al, 1998; Arweiler et al, 2004; Auschill et al, 2004; Auschill et al, 2005; Dige et al, 2009a). Zaura-Arite et al (Zaura-Arite et al, 2001), empleando discos de dentina bovina, tallaron 3 surcos paralelos perpendiculares a la superficie (cada uno de 200 μm de ancho y aproximadamente 500 μm de profundidad) con el fin de imitar la estructura del diente natural. Otros autores han descrito la formación del B-PD sobre materiales dentales de restauración utilizando diferentes sustratos, como amalgama, oro, cerámica, resinas compuestas, cemento de vidrio ionómero y polimetilmetacrilato (Auschill et al, 2002; Konishi et al, 2003; Perez et al, 2007).

Con objeto de recoger placa dental subgingival sin alterar su estructura, Wecke et al (Wecke et al, 2000) diseñaron unos transportadores constituidos por membranas de láminas de oro o politetrafluoroetileno, que eran insertados en las bolsas periodontales de los pacientes que sufrían periodontitis rápidamente progresiva. En otro experimento, Schaudinn et al (Schaudinn et al, 2009) estudiaron *in vivo* el biofilm bacteriano que colonizaba los conductos radiculares de dientes extraídos después de un fracaso endodóntico.

1.4.2. Aplicabilidad de la microscopía de barrido láser confocal

A lo largo de los años, se han utilizado diferentes técnicas de microscopía para visualizar la microestructura de los B-PD *in vivo*, incluyendo la microscopía óptica, la microscopía electrónica de transmisión y la microscopía electrónica de barrido (Listgarten et al, 1975; Listgarten 1976; Hannig 1999; Hannig et al, 2007). Con estas técnicas es difícil conseguir imágenes de los especímenes en profundidad y, además, éstos requieren de un procesamiento que incluye deshidratación, fijación e inclusión, lo que podría ocasionar

retracción y pérdida de la matriz del biofilm (*Handley et al, 1993*). La microscopía electrónica de transmisión frecuentemente artefacta las preparaciones, afectando principalmente a las delicadas estructuras rellenas de fluido (*Wood et al, 2000*). La microscopía de barrido láser confocal (en inglés “Confocal Laser Scanner Microscopy”; CLSM), a pesar de tener peor resolución que la microscopía electrónica de transmisión (*Dige et al, 2007*), ha eliminado o reducido considerablemente estos problemas. La CLSM se ha utilizado en el ámbito de las ciencias biológicas desde 1961, cuando se introdujo el concepto de “secciones ópticas” de un espécimen biológico. Las muestras se visualizan mediante luz de emisión estimulante empleando un rayo láser de baja potencia, después de la incorporación de agentes fluorescentes de contraste. La principal ventaja de la CLSM es que permite analizar el biofilm *in situ*, sin alterar su delicada estructura, manteniéndolo hidratado y sin necesidad de fijarlo o secarlo (*Costerton et al, 1994; Donlan y Costerton, 2002; Arweiler et al, 2004*). El microscopio láser confocal facilita, además, la observación de los biofilms *in vivo* y en tiempo real, con todas las ventajas del análisis de imagen más sofisticado (*Costerton y Lewandowski, 1997*). Así, permite la extracción digital de secciones ópticas muy finas (0,5-2 μm) hasta grandes profundidades (desde la superficie del biofilm hasta su base), con la ventaja añadida de que elimina la interferencia óptica autofocus, admite el examen directo de las complejas relaciones x-z y x-y que existen entre las bacterias y su entorno, y mejora significativamente la resolución lateral (*Wright y Wright, 2002*). En consecuencia, se ha sugerido que la CLSM puede aportar información detallada sobre la morfología y el metabolismo celular, la química del microambiente, y la arquitectura física y química de la matriz del biofilm y de los polímeros asociados (*Costerton et al, 1995*).

Numerosos autores han analizado los biofilms con la ayuda de la CLSM incorporando una tinción de fluorescencia, tanto para analizar su

estructura (Netuschil *et al*, 1998; Pratten *et al*, 2000; Wood *et al*, 2000), como la distribución espacial de las bacterias viables y no viables (Auschill *et al*, 2001; Hope *et al*, 2002; Hope y Wilson, 2004; Hope y Wilson, 2006). El primero en aplicar la fluorescencia para el estudio de la vitalidad de los biofilms fue Netuschil en 1983 (Netuschil, 1983). Desde entonces se han utilizado diversas tinciones, como naranja de acridina (Korber *et al*, 1993), fluoresceína (Wood *et al*, 2000), diacetato de fluoresceína combinada con bromuro de etidio (Netuschil *et al*, 1998; Auschill *et al*, 2001; Zaura-Arite *et al*, 2001; Auschill *et al*, 2005), y SYTO 9 combinado con yoduro de propidio (Donlan y Costerton, 2002; van der Mei *et al*, 2006). Estas combinaciones de fluorocromos ofrecen la posibilidad de teñir de forma selectiva las bacterias vivas y muertas, por lo que han sido ampliamente utilizadas para analizar la viabilidad bacteriana en la mayoría de los estudios *in vivo* sobre B-PD (especialmente la fluoresceína con bromuro de etidio) (Netuschil *et al*, 1998; Auschill *et al*, 2001; Zaura-Arite *et al*, 2001; Auschill *et al*, 2005; van der Mei *et al*, 2006; Arweiler *et al*, 2008). Por lo tanto, esta técnica se considera particularmente útil en el análisis de la distribución espacial de la viabilidad bacteriana dentro del biofilm y de la actividad antimicrobiana de determinados antisépticos, como la clorhexidina (Hope y Wilson, 2004; van der Mei *et al*, 2006; Filoche *et al*, 2007).

Se ha demostrado que es imprescindible emplear una combinación de diferentes técnicas microbiológicas para conseguir una representación fidedigna de la distribución espacial bacteriana y de la dinámica del B-PD, y para poder examinar el papel de las distintas especies como agentes microbianos coadhesivos en la placa dental (Al-Ahmad *et al*, 2007; Jung *et al*, 2010). Las técnicas que se han utilizado con mayor frecuencia para favorecer la visualización de los elementos que conforman el biofilm bajo el CLSM son la tinción directa con fluorocromos, los anticuerpos marcados con fluorocromos y la hibridación *in situ* fluorescente (FISH).

Los anticuerpos policlonales marcados con fluorocromos se han utilizado para analizar los estadios iniciales del desarrollo del biofilm, y las interacciones específicas entre los colonizadores pioneros y la superficie del diente (*Robinson et al, 1997; Palmer et al, 2003; Robinson et al, 2006*). Además, permiten identificar algunas especies relevantes de la comunidad microbiana oral que conforma el B-PD (*Gu et al, 2005; Robinson et al, 2006*). Esta aproximación metodológica no altera la estructura del biofilm y admite analizar simultáneamente la prevalencia relativa y la distribución espacial de varios géneros/especies patógenos en el B-PD desarrollado *in vivo*, así como monitorizar los cambios dinámicos que acontecen en el proceso de formación del biofilm (*Gu et al, 2005*).

La FISH es una técnica que incorpora sondas de ADN específicas marcadas mediante fluorescencia, que se ha utilizado en combinación con la CLSM para obtener imágenes tridimensionales de los micronichos naturales del B-PD *in vivo* y para evaluar el protagonismo de diferentes microorganismos en distintos momentos del período de formación del biofilm (*Wecke et al, 2000; Auschill et al, 2002; Al-Ahmad et al, 2007; Chalmers et al, 2007; Dige et al 2009a; Dige et al, 2009b; Jung et al, 2010*). Entre sus ventajas se incluyen la posibilidad de detectar bacterias no-cultivables, y la rapidez con que se pueden desarrollar nuevas sondas en comparación con el proceso de producción y caracterización de anticuerpos (*Al-Ahmad et al, 2007*). Una de sus principales limitaciones es que su sensibilidad está condicionada por el estado metabólico de la bacteria en el interior del biofilm (*Dongari-Bagtzoglou, 2008*). Además, la FISH requiere la fijación del espécimen - lo que exige su deshidratación- y no permite estudiar los cambios dinámicos que ocurren en el biofilm (*Gu et al, 2005; Dongari-Bagtzoglou, 2008*).

En algunos artículos sobre B-PD *in vivo* no-desestructurado, aplicando anticuerpos marcados con fluorocromos o FISH en combinación con CLSM, los anticuerpos y las sondas de oligonucleótidos se conjugaron o marcaron con diferentes fluorocromos, para identificar un género/especie bacteriano determinado, todas las bacterias o incluso componentes bacterianos como la matriz extracelular de exopolisacáridos (Robinson *et al*, 1997; Wecke *et al*, 2000; Auschill *et al*, 2002; Palmer *et al*, 2003; Robinson *et al*, 2006; Al-Ahmad *et al*, 2007; Chalmers *et al*, 2007; Dige *et al*, 2007; Dige *et al* 2009a; Dige *et al*, 2009b; Jung *et al*, 2010). En este tipo de estudios, uno de los problemas inherentes al empleo de la CLSM es que la disponibilidad de colores de sondas fluorescentes sin que se solapen señales de emisión es limitada, lo que significa que en cada imagen sólo pueden distinguirse entre 2 y 4 especies microbianas, dependiendo de las características del microscopio (Dige *et al*, 2009b).

1.4.3. Características estructurales del biofilm oral

En la literatura se ha reconocido la importancia de la relación estructura-comportamiento del B-PD no-desestructurado *in vivo* y su implicación en la patogénesis de algunas infecciones orales (Marsh, 2005). Específicamente, Wood *et al* (Wood *et al*, 2000) afirmaron que la estructura del B-PD probablemente representa un factor importante en la modulación de la fisiología bacteriana y en la diferenciación del nicho ecológico. En este sentido, el comportamiento microbiano dependerá de parámetros como el grosor del biofilm, su densidad, su arquitectura (más o menos abierta) y la relación célula-matriz (Wood *et al*, 2000). En consecuencia, un mejor conocimiento de estas características estructurales puede favorecer el desarrollo de estrategias más eficaces en el manejo de la caries y la enfermedad periodontal (Wood *et al*, 2000; Arweiler *et al*, 2004; Al-Ahmad *et al*, 2007).

Hasta la fecha, se han publicado algunos artículos sobre la estructura tridimensional del B-PD no-desestructurado *in vivo* empleando la CLSM. A continuación se describen en profundidad los resultados de estos trabajos en relación al grosor del biofilm, su arquitectura, la viabilidad y la topografía bacterianas.

Grosor

En 1998, Netuschil et al (*Netuschil et al, 1998*) observaron por primera vez, que el grosor del B-PD que se formaba sobre discos de esmalte y vidrio insertados en una férula de acrílico, dependía de la “edad” del biofilm y variaba ostensiblemente de un individuo a otro (B-PD de 1 día= 0-10 μm ; B-PD de 2 días= 8-35 μm ; B-PD de 3 días= 6-45 μm). Posteriormente, otros autores confirmaron esta gran variabilidad interindividual del grosor del B-PD (*Auschill et al, 2001; Auschill et al, 2004; Dige et al, 2009a*). En este sentido, Auschill et al (*Auschill et al, 2001*) afirmaron que “la altura de los biofilms orales dependía de la tasa de formación de placa de los donantes individuales”. Sin embargo, Zaura-Arite et al (*Zaura-Arite et al, 2001*) no encontraron diferencias en el grosor de un B-PD de 2 días entre individuos hiper- e hipoproductores de placa (en base al acúmulo medio de proteínas en muestras de placa joven de superficie lisa), aunque estos autores emplearon un modelo ranurado para favorecer el crecimiento del biofilm. En la misma línea, Arweiler et al (*Arweiler et al, 2004; Arweiler et al, 2008*) demostraron que el riesgo de caries -evaluado en base a la concentración de *Streptococcus mutans*- el número de dientes cariados, ausentes y obturados, el flujo salival y la tasa de formación de ácido láctico no tenían ninguna correlación con el grosor del B-PD a las 48 horas ni a los 5 días de subsistencia. En otros estudios *in vivo* sobre B-PD, se evaluó el impacto de algunos factores locales sobre el grosor del biofilm en un mismo individuo, incluyendo el modelo de dispositivo intraoral utilizado para la recogida del biofilm (*Wood et al, 2000*), el tipo de sustrato (*Netuschil et al, 1998; Wood et al, 2000; Auschill et al, 2001;*

Zaura-Arite et al, 2001; Arweiler et al, 2004; Gu et al, 2005; Al-Ahmad et al, 2007; Dige et al, 2009a) o incluso diferentes zonas del mismo sustrato (Arweiler et al, 2004). Por otra parte, Al-Ahmad et al (Al-Ahmad et al, 2007) encontraron que el grosor del B-PD, que se formaba sobre fragmentos de esmalte bovino fijados en un dispositivo de acrílico individualizado, aumentaba de $14,9 \pm 5,0 \mu\text{m}$ el primer día, hasta $49,3 \pm 11,6 \mu\text{m}$ a los 7 días. Sin embargo, paradójicamente, se ha demostrado que este incremento del grosor del biofilm no es progresivo todos los días (Al-Ahmad et al, 2007; Al-Ahmad et al, 2010). La influencia significativa del factor “edad” de la placa ha sido corroborada en estudios recientes, en los que se analizaron períodos cortos de exposición oral, como los publicados por Dige et al (B-PD de 6 horas, 12 horas, 1 día y 2 días) y Jung et al (B-PD de 30 minutos, 2 horas y 6 horas) (Dige et al, 2009a; Jung et al, 2010). No obstante, se ha observado que los depósitos microbianos a los 2 días -al igual que en estadios previos- no tienen un grosor uniforme (Dige et al, 2007).

Arquitectura

Algunos autores han analizado *in vivo* las características arquitecturales del B-PD de menos de 24 horas (Palmer et al, 2003; Dige et al, 2007; Jung et al, 2010). En un biofilm de 30 minutos, Jung et al (Jung et al, 2010) encontraron que las bacterias que se depositaban sobre el esmalte y la dentina se distribuían aleatoriamente, aunque en los especímenes de dentina se localizaban preferentemente en las aberturas de los túbulos dentinarios. En las primeras 2 horas de exposición oral se observan fundamentalmente muchas bacterias aisladas y pequeños agregados, mientras que a partir de las 6 horas se detectan acúmulos de colonias y cadenas bacterianas monocapa. Dige et al (Dige et al, 2007), después de estudiar un B-PD de 6 horas de maduración, describieron 3 patrones diferentes de colonización bacteriana: bacterias aisladas, bacterias apareadas y grupos de bacterias de tamaño variable.

Palmer et al (*Palmer et al, 2003*) observaron que en un B-PD de 8 horas, aunque existían algunas células aisladas, la mayor parte de la biomasa formaba parte de agregados celulares heterogéneos (probablemente constituidos por varios tipos celulares), a diferencia del predominio de bacterias aisladas detectado en el B-PD de 4 horas. Estos autores estimaron que entre las 4 y las 8 horas de maduración del biofilm, el número de células podía llegar a multiplicarse por 40 ($2 \times 10^2 - 6,8 \times 10^3 / 250.000 \mu\text{m}^2$ a las 4 horas y $4,5 \times 10^3 - 1,4 \times 10^4 / 250.000 \mu\text{m}^2$ a las 8 horas). En consecuencia, sugirieron que las microcolonias multiespecie observadas a las 8 horas estaban constituidas por una combinación de bacterias planctónicas sujetas a otras células adheridas previamente y por las células que se multiplicaban en la microcolonia (*Palmer et al, 2003*). Por otra parte, se ha señalado que la coadhesión de bacterias procedentes de la saliva es un proceso que incorpora ininterrumpidamente biomasa al biofilm en formación, lo que se confirma al comprobar la diversidad genotípica de las bacterias que colonizan la capa más superficial del B-PD (*Dige et al, 2009b*). La implicación de un “mecanismo de crecimiento bacteriano” se ha verificado en otras series de B-PD *in vivo* de 6 y 12 horas de maduración, puesto que muchas bacterias se detectan durante el proceso de división celular, como refleja su propia morfología (*Dige et al, 2007*). Por lo tanto, la división celular contribuye significativamente al incremento de la biomasa (*Dige et al, 2009b*). Este hecho, junto al crecimiento exponencial de las bacterias durante los 2 primeros días de formación del biofilm (*Nyvad y Kilian, 1987*), secundan la hipótesis de que el crecimiento de la biomasa del B-PD inicial ocurre fundamentalmente por multiplicación celular (*Brex et al, 1983; Bos et al, 1999*).

Una aportación relevante proporcionada por Dige et al (*Dige et al, 2007*), después de estudiar un B-PD de 12 horas, fue que “la mayoría de los planos analizados estaban próximos a la superficie del cristal”. La razón esgrimida por estos autores es que las colonias monocapa de

bacterias morfológicamente alargadas o filamentosas, se orientan predominantemente con su eje mayor paralelo a la superficie del sustrato; por el contrario, las bacterias pleomórficas de las colonias multicapa se orientan frecuentemente con su eje mayor perpendicular a la superficie (Nyvad y Fejerskov, 1987a; Nyvad y Fejerskov, 1987b; Nyvad y Fejerskov, 1989), lo que dificulta considerablemente distinguir entre especies cocoides y pleomórficas en el plano x-y. En la mayoría de los individuos se observan grandes cocos de 1-2 μm de taxonomía desconocida, típicamente asociados por parejas, tétradas o acúmulos. Este patrón de crecimiento se confirmó por la presencia de microcolonias que protuían formando estructuras con forma de “chimenea”. Dige et al (Dige et al, 2007) señalaron que “este particular patrón de crecimiento podía reflejar un entorno físico constreñido durante la etapa de expansión del biofilm”.

En varios estudios *in vivo* sobre B-PD de al menos 24 horas de evolución, las imágenes proporcionadas por el microscopio electrónico sugerían que el biofilm tenía una arquitectura compacta (Listgarten et al, 1975; Listgarten, 1976; Nyvad y Kilian, 1987). Por el contrario, en base a las observaciones efectuadas posteriormente mediante CLSM, numerosos autores coinciden en que el B-PD tiene una arquitectura abierta y heterogénea, que se caracteriza por la presencia de un sistema complejo de canales y oquedades, que forman parte de la propia estructura del biofilm (Wood et al, 2000; Auschill et al, 2001; Zaura-Arite et al, 2001; Auschill et al, 2004; Arweiler et al, 2004). Las primeras descripciones de la arquitectura del B-PD *in vivo* se deben a Wood et al (Wood et al, 2000), que confirmaron la heterogeneidad estructural de un biofilm de 4 días en términos de distribución de células, matriz y oquedades. Sorprendentemente, todas las muestras analizadas contenían poros y canales llenos de fluido, que en ocasiones ocupaban todo el grosor del biofilm. Estos canales estaban rodeados por agregados de células y matriz extracelular, y colonizados por un

escaso número de bacterias, como demostraron Dige et al (*Dige et al, 2007*) aplicando técnicas de gran magnificación. Auschill et al (*Auschill et al, 2001*), al analizar un B-PD de 5 días, localizaron unas oquedades con morfología de “burbujas” en el grosor del biofilm que no se teñían con los fluorocromos convencionales, sugiriendo que podrían estar rellenas de sustancias biológicas como exopolisacáridos y glicoproteínas. En este sentido, Dige et al (*Dige et al, 2007*) reconocieron que, para clarificar definitivamente la estructura de estos canales y oquedades, eran necesarios más estudios *in vivo*, aplicando sondas fluorescentes para componentes específicos de la matriz.

En 2006, Robinson et al (*Robinson et al, 2006*) comunicaron dos interesantes aspectos sobre la arquitectura de un B-PD de 7 días de evolución: la presencia de un patrón bastante consistente en la distribución de la biomasa (la densidad de la biomasa aumentaba hacia el interior de la interfase placa-saliva) y la frecuencia de canales también disminuía en esta dirección. Esta arquitectura abierta del B-PD, con canales y huecos, presumiblemente proporciona una comunicación directa entre el ambiente de la cavidad oral y la superficie del esmalte (*Wood et al, 2000*). Este particular “sistema circulatorio” podría tener importantes implicaciones para el desplazamiento de los ácidos orgánicos que dañan el esmalte, las toxinas bacterianas y otros antígenos, así como para la liberación de agentes antimicrobianos en las dianas seleccionadas en el interior del biofilm (*Wood et al, 2000*), aunque la función de esta red de canales aún no se ha aclarado definitivamente (*Dige et al, 2007*).

En la misma línea de estos hallazgos descritos en biofilm joven de 12 horas (*Dige et al, 2007*), algunos investigadores afirman que el patrón y el grado de repoblación bacteriana en B-PD de 1 y 2 días de evolución varía ostensiblemente no sólo entre individuos, sino también entre superficies en un mismo individuo (*Zaura-Arite et al, 2001; Dige et*

al, 2007; Dige et al, 2009b). Además, Zaura-Arite et al (*Zaura-Arite et al, 2001*) y Dige et al (*Dige et al, 2007*) demostraron que la complejidad del biofilm aumentaba con el tiempo de maduración y el grosor. En los especímenes gruesos es posible identificar determinados patrones estructurales, como acúmulos de células elongadas, posicionadas perpendicularmente a la superficie externa de la placa y separadas por áreas acelulares con pequeñas conexiones entre los espacios adyacentes (*Zaura-Arite et al, 2001*). Por otra parte, Dige et al (*Dige et al, 2007*) describieron la colonización bacteriana progresiva del sustrato, en la que coexisten áreas monocapa entremezcladas con otras multicapa. Estos autores estimaron que en los B-PD de 2 días podía haber diferencias interindividuales -de hasta 12,5 veces- en el número de bacterias totales que colonizan las superficies (*Dige et al, 2009a*).

Con la finalidad de investigar la relación entre la fisiología y la estructura del B-PD, von Ohle et al (*von Ohle et al, 2010*) analizaron la actividad metabólica -consumo de oxígeno y formación de ácido- en un biofilm de 3 días expuesto a sacarosa. La adición de este azúcar tiene un impacto significativo en la producción de iones de hidrógeno y en la acidificación (con un factor multiplicativo de hasta 1.000), por lo que el pH en la base del biofilm disminuyó hasta valores que oscilaron entre 3,97 y 4,66 (en contraste con el pH neutro que es de 7). Estos autores señalaron, además, que el grado de acidificación varía entre individuos en función de factores del huésped y del componente bacteriano del propio biofilm, que condicionan su grosor, la concentración de bacterias acidofílicas y la bioquímica salival.

Viabilidad bacteriana

En algunos estudios, en los que se aplicaron técnicas convencionales de cultivo microbiológico y fluorescencia vital, se demostró que en la placa dental joven y escasa predominaba la materia muerta sobre los microorganismos vivos (*Netuschil et al, 1995; Weiger et al, 1995 y*

Weiger et al, 1997). En la misma línea, en 1998, Netuschil et al (Netuschil et al, 1998), analizando especímenes de B-PD *in vivo* de 1, 2 y 3 días mediante CLSM, localizaron bacterias vivas preferentemente en la parte superior de un estrato denso de material muerto. Por el contrario, Zaura-Arite et al (Zaura-Arite et al, 2001) observaron, en muestras de B-PD de 2 días, que los acúmulos de bacterias vivas se entremezclaban con material muerto. Este hallazgo sustenta la hipótesis de que las bacterias muertas, más que las vivas, se adhieren a superficies sólidas, aunque otra posible explicación radica en los factores antibacterianos presentes en la saliva humana y en sus efectos sobre el B-PD (Scannapieco, 1994; Kage y Bernimoulin, 1995; Tenovuo 1998; Weiger et al, 1999).

Los microorganismos vivos, localizados sobre estos estratos muertos o embebidos en ellos, pueden ser responsables del ulterior crecimiento de la placa (Netuschil et al, 1998). Las bacterias muertas proporcionan suplementos nutritivos que favorecen el rápido crecimiento de la flora viva (Critchley 1969; Wimpenny 1995, Netuschil et al, 1998) y la protegen contra los agentes antibacterianos del propio ecosistema oral (Auschill et al, 2001). En consecuencia, se ha determinado que el material celular muerto representa un componente primordial de la biomasa durante los estadios iniciales de acumulación y desarrollo del B-PD (Netuschil et al, 1998; Auschill et al, 2001). En estos biofilms se han descrito estructuras cavitadas (“agujeros negros”) rodeadas por bacterias vivas, lo que podría significar que estas bacterias tienen acceso directo a los nutrientes que difunden a través de poros y oquedades (de Beer et al, 1994; Lawrence et al, 1991; Singleton et al, 1997).

En los estudios realizados *in vivo* por Arweiler et al (Arweiler et al, 2004), Auschill et al (Auschill et al, 2005) y von Ohle et al (von Ohle et al, 2010) sobre la vitalidad del biofilm tras 2 y 3 días de maduración, se

alcanzó una vitalidad bacteriana media de 60-77%. En otra serie, la viabilidad en un B-PD de 5 días fue de 57-63% (Arweiler et al, 2008). Algunos autores han señalado que la vitalidad bacteriana aumenta a medida que lo hace el período de maduración del biofilm y consecuentemente su grosor (Auschill et al, 2001; Zaura-Arite et al, 2001).

Se han descrito grandes diferencias inter-individuales en la disposición de las bacterias vivas y muertas (Zaura-Arite, 2001), por lo que no parece existir un patrón general de distribución de la vitalidad bacteriana (Zaura-Arite, 2001; von Ohle et al, 2010). Por el contrario, Arweiler et al (Arweiler et al, 2004) sugirieron que en cada participante en estos estudios existe un ambiente ecológico relativamente constante, lo que obviamente conduce a un patrón de identidad microbiana. En este sentido, Arweiler et al (Arweiler et al, 2004) identificaron 3 patrones de vitalidad en el B-PD de 2 días: en el primero, un gran número de bacterias muertas (vitalidad baja) se acumulan en las capas más próximas al sustrato, la vitalidad aumenta en los estratos más altos y termina nuevamente con valores bajos en los estratos más superficiales del biofilm; en el segundo patrón, cuando estas bacterias son recubiertas por células vivas, o proliferan algunas de las bacterias que todavía sobreviven o son cultivables, forman una nueva capa de B-PD vital; en el tercer patrón, el biofilm exhibe valores elevados de vitalidad bacteriana en la capa próxima al sustrato, disminuyendo progresivamente hacia el exterior.

Auschill et al (Auschill et al, 2001) observaron que la distribución de la vitalidad bacteriana en B-PD acumulados sobre superficies lisas durante 5 días tenía un perfil similar al primer patrón descrito: el porcentaje de bacterias vivas era más bajo en el área adyacente a la superficie del esmalte, aumentaba siguiendo el eje z hacia la zona central y disminuía nuevamente hacia los estratos exteriores. Por el

contrario, Arweiler et al (Arweiler et al, 2008) demostraron en un B-PD de 5 días, un patrón de vitalidad más parecido al segundo de los que hemos descrito, con valores más bajos en los estratos inferiores (vitalidad= 51%) y más altos en las capas superficiales (vitalidad= 65%), confirmando que las bacterias próximas al sustrato suelen ser metabólicamente inactivas (zonas latentes) (ten Cate y Marsh, 1994; Netuschil et al, 1998).

Arweiler et al (Arweiler et al, 2004) describieron una gran variabilidad no sólo inter-individual sino también intra-individual (entre las diferentes capas del grosor del biofilm) en un B-PD de 2 días. Sin embargo, estos mismos autores, en un trabajo publicado posteriormente (Arweiler et al, 2008), no detectaron diferencias estadísticamente significativas en la vitalidad bacteriana entre las capas basales, intermedias y superficiales de un B-PD de 5 días.

Topografía bacteriana

El B-PD es un ecosistema microbiano complejo que se caracteriza por su variabilidad espacio-temporal en la composición de especies bacterianas. A pesar de esta versatilidad, se ha consensuado que el B-PD tanto supra- como subgingival se desarrolla siguiendo un patrón secuencial y reproducible (Palmer et al, 2003). La colonización microbiana de la superficie de los dientes es un proceso selectivo, en el que, como se ha señalado previamente, en el biofilm inicial predominan determinadas especies bacterianas, a las que se suman los colonizadores secundarios (Kolenbrander y London, 1993; Quirynen et al, 2005). Diaz et al (Diaz et al, 2006) señalaron que la caracterización de la microflora inicial constituye el primer escalón para comprender las interacciones entre los miembros de la comunidad que modelan el subsiguiente desarrollo del biofilm. Estos autores, aplicando métodos de biología molecular en una muestra de esmalte, determinaron *in vivo* la diversidad microbiana de un B-PD joven (de 4 y 8 horas). En los 3

participantes los microorganismos predominantes fueron *Streptococcus* spp., fundamentalmente del grupo *Streptococcus oralis*/*Streptococcus mitis*; otros géneros observados con frecuencia fueron *Actinomyces*, *Gemella*, *Granulicatella*, *Neisseria*, *Prevotella*, *Rothia* y *Veillonella*.

Dige et al (Dige et al, 2009a), aplicando un método estereológico para la cuantificación de bacterias en B-PD *in vivo* en función del tiempo (6 horas, 12 horas, 1 y 2 días), descubrieron que durante el período de observación, en la mayoría de los participantes en el estudio existía una relación relativamente constante entre la concentración de *Streptococcus* y otros géneros bacterianos (el número de *Streptococcus* era aproximadamente 15 veces mayor que el de otras bacterias). En consecuencia, estos autores afirmaron que los *Streptococcus* spp. desempeñan un papel relevante en el incremento de la masa total de los biofilms jóvenes durante su período de desarrollo. Según Jung et al (Jung et al, 2010), los *Streptococcus* spp. exhiben dos propiedades especialmente notables en este contexto: por un lado, su tiempo de duplicación es de sólo 1,4 horas, considerablemente más corto que el de otras especies bacterianas (Beckers y van der Hoeven, 1984); por otra parte, expresan numerosas adhesinas, con afinidad por los receptores de la película adquirida que recubre el esmalte (Douglas, 1994; Scannapieco, 1994; Demuth et al, 1996; Egland et al, 2001; Takahashi et al, 2002). La presencia de otras bacterias aerobias como *Neisseria* spp. o aerotolerantes como *Gemella* spp., puede proporcionar un nicho ecológico favorable para la colonización subsiguiente o concomitante de anaerobios facultativos y estrictos, que habitualmente completan la transición de aerobias a anaerobias que culmina el desarrollo del biofilm bacteriano oral (Marsh y Martin, 1999). En este sentido, von Ohle et al (von Ohle et al, 2010) demostraron la existencia de una zona de anaerobiosis (con valores de saturación de oxígeno inferiores a 0,5%) en los estratos más profundos del B-PD de 3 días, generados *in vivo*.

Díaz et al (Díaz et al, 2006) señalaron que el B-PD de cada individuo es único en términos de diversidad y composición, lo que sugiere que las interacciones espacio-temporales y los cambios ecológicos inherentes a la maduración del biofilm son individuo-dependientes (Díaz et al, 2006). En este sentido, Dige et al (Dige et al, 2009a) encontraron diferencias inter-individuales de hasta 12,5 veces en el número total de *Streptococcus* spp. que colonizaban biofilms de 2 días. Se ha postulado que los miembros de una comunidad bacteriana específica se han adaptado entre ellos y con el hospedador, creando relaciones entre los integrantes de dicha comunidad que garantizan su reproducibilidad espacio-temporal y su estabilidad en términos de composición bacteriana (Díaz et al, 2006). La estabilidad de los ecosistemas se correlaciona con la diversidad (McCann, 2000; Boles et al, 2004) y la resiliencia de los B-PD puede acentuarse cuando aumenta su microdiversidad (Palmer et al, 2006). En general el B-PD es una comunidad con una importante resiliencia; si se efectúan prácticas de higiene oral adecuadas, la placa supragingival se elimina diariamente, pero rápidamente se restablece (Marsh y Martin, 1999).

Como ya se ha comentado en la sección 1.2.2., un factor determinante para la colonización inicial en la primera etapa de formación del B-PD es la película adquirida salival, imprescindible para las posteriores fases de adhesión y colonización bacteriana de la superficie del diente (Lendenmann et al, 2000). En este sentido, Jung et al (Jung et al, 2010) demostraron que en el B-PD *in vivo* no hay una adhesión directa de los microorganismos a las superficies de dentina y esmalte. Por consiguiente, siempre existen estructuras de la película que comunican las bacterias y los tejidos duros del diente (bajo el microscopio electrónico de barrido, el grosor medio de la película adquirida es de 10-20 nm sobre las superficies de dentina y de hasta 100 nm sobre las estructuras globulares y granulares del esmalte).

Dos procesos fundamentales para el desarrollo del biofilm son la coadhesión y la coagregación (sección 1.2.2.). Aunque numerosos investigadores han estudiado *in vitro* la coagregación bacteriana (Cisar *et al*, 1979; Guggenheim *et al*, 2001b; Foster y Kolenbrander, 2004; Nagaoka *et al*, 2008), es difícil establecer la existencia y el significado de la coagregación *in vivo* (Palmer *et al*, 2003; Palmer, 2010). Se considera que esta propiedad favorece el predominio de los *Streptococcus* spp. sobre otros colonizadores primarios. Estos estreptococos, una vez que se unen al esmalte, actúan como un nuevo sustrato al que se adhieren otros *Streptococcus* spp. así como bacterias de otros géneros (Kolenbrander *et al*, 2002), favoreciendo el desarrollo de comunidades multibacterianas. Por este motivo, en la mayoría de los trabajos realizados *in vivo*, las investigaciones se han focalizado en las interacciones de los estreptococos entre sí y con otros géneros bacterianos, durante los estadios iniciales de formación del B-PD (Palmer *et al*, 2003; Palmer *et al*, 2006; Chalmers *et al*, 2007; Dige *et al*, 2007).

Con respecto al B-PD de menos de 24 horas, Dige *et al* (Dige *et al*, 2007), aplicando CLSM y FISH, realizaron una descripción sistemática del patrón inicial de formación del biofilm sobre superficies de vidrio. Estos autores observaron que, tras períodos de 6 y 12 horas, las bacterias constituían pequeños agregados monocapa compuestos sólo por *Streptococcus* spp., sólo por otras bacterias o mixtos. Palmer *et al* (Palmer *et al*, 2003) evaluaron el papel de la coagregación intragenérica (entre *Streptococcus* spp.) e intergenérica (entre *Streptococcus* spp. y *Actinomyces* spp.) en la formación de un B-PD de 4-8 horas sobre discos de esmalte. Sus resultados indicaron claramente la omnipresencia de interacciones entre diferentes células cocoides, bien de carácter intragenérico (p. ej., *S. oralis* 34 con *S. gordonii* DL1) o bien intraespecie (p. ej., *S. sanguis* SK163 con *S. sanguis* SK1). Aunque los *Actinomyces* spp. representaron sólo un pequeño porcentaje del B-PD

joven, la coexistencia de células marcadas con anticuerpos contra las fimbrias tipo 2 de *Actinomyces naeslundii* T14V (anti-tipo-2) y de células marcadas con anticuerpos contra los receptores de polisacáridos de los estreptococos (anti-RPS), constituye una prueba indiscutible de que la coagregación y la coadherencia comienzan en los estadios iniciales de formación del B-PD (Palmer et al, 2003).

Se ha especulado que el reconocimiento intercelular entre *Streptococcus* spp. y *Veillonella* spp. puede ser particularmente importante para la formación de placa supragingival, por lo que algunos autores han analizado esta hipótesis en un modelo humano *in vivo* (Palmer et al, 2006; Chalmers et al, 2007). Al examinar un B-PD de 6 horas de maduración, Chalmers et al (Chalmers et al, 2007) detectaron células marcadas con anticuerpos anti-*Veillonella* en el grosor de agregados de estreptococos marcados con anticuerpos anti-PRS, lo que interpretaron como la coexistencia de comunidades bacterianas mixtas. Palmer et al (Palmer et al, 2006), demostraron que el fenotipo (coagregación y reactividad a anticuerpos específicos) y las características genóticas (secuencias del gen ARN16S y perfil genético a nivel de especie) de las cepas dominantes en B-PD de 4 y 8 horas eran variables, confirmando que la microdiversidad en la población de *Veillonella* era individuo-dependiente. En conclusión, estos autores sugirieron que esta personalización de la flora era consecuencia de la gran presión evolutiva que existe para la formación de un B-PD multiespecie, condicionado por los limitados recursos nutricionales de la saliva (Palmer et al, 2006).

En relación a los B-PD de 24 o más horas de maduración, Dige et al (Dige et al, 2007) observaron que la composición de su microflora variaba de un individuo a otro, aunque en todos predominaban los estreptococos, entremezclados con otras bacterias aisladas o agrupadas. Al analizar el biofilm en el plano z, detectaron la presencia

de microcolonias que protuían formando estructuras parecidas a “chimeneas”, integradas fundamentalmente por bacterias no-estreptocócicas rodeadas por estreptococos. El análisis pormenorizado de estas estructuras con forma de “chimenea” reveló características estructurales diferentes. Así, cuando la parte central de este complejo de microcolonias contenía bacterias no-estreptocócicas, estas bacterias solían ocupar todo el trayecto entre la superficie de soporte y la capa más externa del biofilm. Sin embargo, cuando la colonización del área central del biofilm era escasa, las secciones x-y y en el plano z mostraban una región aparentemente sin teñir, cuyo diámetro era mayor en la proximidad de la superficie de soporte; además, la mayoría de estas “chimeneas” escasamente colonizadas estaban cubiertas por una “tapadera” de bacterias. En consecuencia, Dige et al (*Dige et al, 2007*) especularon que “estas estructuras podían representar el resultado de una interrelación nutricional determinada entre diferentes especies microbianas o de procesos específicos de adhesión/coagregación”.

Se ha determinado que otros géneros bacterianos, como el *Actinomyces*, también participan en la colonización inicial de las superficies dentarias, representando hasta el 27% de las bacterias pioneras (*Kilian et al, 1979; Nyvad y Kilian, 1987; Li et al, 2004*). En este sentido, Gu et al (*Gu et al, 2005*) exploraron la posibilidad de emplear 3 anticuerpos monoclonales bien caracterizados contra *Streptococcus mutans*, *Actinomyces naeslundii* y *Lactobacillus casei*, para identificarlos mediante CLSM en muestras de B-PD *in vivo*. En un biofilm de 2 días, *S. mutans* fue la especie predominante, mientras que *L. casei* y *A. naeslundii* se entremezclaban con los estreptococos en las mismas localizaciones. Posteriormente, Dige et al (*Dige et al, 2009b*) describieron el patrón de colonización dinámica que exhibe el *A. naeslundii* en las fases iniciales de formación del B-PD (6 horas-2 días), comparado con el de *Streptococcus* spp. y otras bacterias. Aunque a medida que maduraba el biofilm se comprobó un notable incremento del

número de *Streptococcus* spp. y de *A. naeslundii*, el ritmo de crecimiento de estos últimos disminuía como consecuencia de una ralentización de la división celular y por la formación de prolongaciones filamentosas (colonias aracniformes). En este trabajo, *A. naeslundii* presentó una gran variedad de morfotipos, que incluían formas cocoides (predominantes en los estadios iniciales), o alargadas y filamentosas (más habituales después de 1 ó 2 días). *A. naeslundii* se localizó primordialmente en la zona más profunda del B-PD multicapa, lo que indica que esta especie es una de las que se adhiere directamente a la película adquirida.

En 2007, Al-Ahmad et al (Al-Ahmad et al, 2007) aplicaron FISH y CLSM para analizar *in vivo* los niveles de los géneros bacterianos más relevantes (*Eubacterium* spp., *Streptococcus* spp., *Actinomyces naeslundii*, *Fusobacterium nucleatum* y *Veillonella* spp.) en un B-PD de 1, 2, 3, 5 y 7 días. Todas estas bacterias fueron identificadas en el curso de los 7 días de formación del biofilm y representaron el 35,5-59,8% de la masa bacteriana total. Se detectaron coagregaciones de *Streptococcus* spp., *Actinomyces naeslundii*, *Fusobacterium nucleatum* y *Veillonella* spp., confirmando el papel de los estreptococos orales particularmente en los estadios iniciales de formación del B-PD (representaron el 41% de las bacterias el día 1, frente al 13% el día 7); *A. naeslundii* constituyó el 18% de la microbiota en los primeros días, disminuyendo después de forma significativa. Sin embargo, los niveles de *Veillonella* spp. no variaron ostensiblemente durante el período de formación del biofilm y, paradójicamente, se constató un incremento progresivo de *F. nucleatum* en el biofilm más grueso y maduro (10% del total de bacterias el día 1, frente al 22% el día 7).

Un artículo publicado por Wecke et al en 2000 (Wecke et al, 2000), probablemente es el primero en el que se evaluó el número y la distribución espacial de las espiroquetas en el biofilm subgingival. A

gran aumento se comprobó que las espiroquetas se entremezclaban con otras bacterias, aunque en ocasiones estaban aisladas en un área determinada (especialmente los treponemas). Los autores señalaron en sus conclusiones que aún no se disponía de información detallada sobre la estructura del B-PD en el hábitat subgingival.

1.5. ELIMINACIÓN/CONTROL DEL BIOFILM ORAL MEDIANTE AGENTES ANTIMICROBIANOS

Se han descrito varios métodos que pueden alterar los mecanismos de formación del biofilm oral, bien impidiendo su constitución, bien destruyendo el biofilm existente, o bien eliminando microorganismos individuales del interior del B-PD (*Wilson y Pratten 1999*). Como ya hemos señalado, el crecimiento de comunidades bacterianas estructuradas sobre una superficie difiere fenotípicamente de sus homólogos en fase planctónica (*Hoyle et al, 1993; Costerton et al, 1995*). En consecuencia, se ha sugerido que las bacterias sésiles se comportan como células en un organismo multicelular (por ejemplo, colaborando y comunicándose como un sistema circulatorio básico) (*Lewandowski et al, 1992; Singleton et al, 1997; Pratten et al, 2000*).

Estas características pueden explicar en parte, por qué las bacterias que constituyen un biofilm pueden ser entre 10 y 1000 veces más resistentes al tratamiento antimicrobiano que las que crecen en fase planctónica (*Melsen et al, 1983; Anwar et al, 1992; Costerton et al, 1995; Sissons et al, 1996; Wilson et al, 1996; Gilbert et al, 1997; Netuschil et al, 1997; Helmerhorst et al, 1999; Davies, 2003*). Concretamente, Pratten y Wilson (*Pratten y Wilson, 1999*) demostraron que los microorganismos que crecían en un biofilm oral generado *in vitro* eran hasta 250 veces más resistentes a la clorhexidina que sus homólogos planctónicos (*Pratten y Wilson, 1999*). Incluso después de 60 minutos de exposición a clorhexidina al 0,2%, un número sustancial de bacterias sobrevivían en el interior del biofilm (*Wilson et al, 1998*).

Este hallazgo podría justificarse en base a un ritmo de crecimiento lento del biofilm (*Nickel et al, 1985; Gristina et al, 1987; Costerton et al, 1999*), a problemas del agente antimicrobiano para penetrar en su grosor, o a su inactivación (*Foley and Gilbert, 1997*).

Un prerequisite para que un agente antimicrobiano sea eficaz, es que todas las bacterias que integran el biofilm estén expuestas a una concentración adecuada de dicho agente durante un tiempo determinado, a fin de que el biofilm se reduzca de forma clínicamente objetivable (*von Ohle et al, 2010*). La tasa de penetración del agente antimicrobiano, así como la profundidad que alcanza en el espesor del biofilm, dependen de factores como la estructura y la composición de dicho biofilm (*Wood et al, 2000; Watson et al, 2005*), aunque probablemente son más importantes su grosor (*Stewart, 2003*) y sus características físico-químicas (*Wood et al, 2000; Watson et al, 2005*). Se ha constatado que el transporte de partículas en el biofilm no es un proceso instantáneo (*Watson et al, 2005*), confirmándose que el paso de disoluciones con altas concentraciones de solutos a través de biofilms gruesos (> 1 mm) requiere de una exposición continua y prolongada en el tiempo, y que la penetración se retrasa aún más si el soluto interacciona con la biomasa (*Stewart, 1998*).

Aunque no se ha confirmado definitivamente si la arquitectura del B-PD influye en la tasa o el patrón de transporte de partículas, en biofilms no-dentales se ha demostrado que la transferencia de solutos a través de los canales es más rápida que a través de la biomasa densa, porque la resistencia a la difusión es menor (*Zhang y Bishop, 1994*) y/o por convección (*de Beer y Stoodley, 1995*). Mientras que la convección puede ser mínima en el B-PD, hay alguna evidencia de que las tasas de penetración de solutos a través del biofilm son inversamente proporcionales a la densidad de la biomasa (*Tatevossian, 1985*). La densidad del B-PD aumenta desde la capa externa más superficial

hacia su interior (*Robinson et al, 2006*), lo que explicaría por qué los solutos difunden con más facilidad en los estratos externos de la placa que entre los más profundos (*Watson et al, 2005*). No obstante, Robinson et al (*Robinson et al, 2006*) observaron que los B-PD de 7 días, o al menos sus capas más externas, eran resistentes a insultos mecánicos y químicos (exponiendo el biofilm a cloruro sódico al 0,9% y al 9%, así como a un pH ácido), pero este escenario cambiaba dramáticamente ante la presencia de detergentes.

Por otra parte, la penetración de solutos durante períodos de exposición muy breves (inferiores a 120 segundos) ha sido por el momento objeto de escasas investigaciones (*Watson et al, 2005*). Hasta la fecha, se han evaluado modelos de biofilm *in vitro* con rangos de exposición a agentes antimicrobianos desde varios minutos (*Thurnheer et al, 2003*) hasta horas (*Stewart et al, 2001*), lo cual tiene una relevancia limitada para la cavidad oral, en la que la exposición a los agentes antimicrobianos suele oscilar entre 30 segundos y 1 minuto (*Schiött et al, 1970; Buckner et al, 1994; Serrano-Granger y Herrera, 2005*).

En relación a la cavidad oral, se ha determinado que junto a la mejora individual de la higiene oral mecánica (por ejemplo complementando el cepillado con el empleo del hilo dental), la prevención y el tratamiento de la patología oral se alcanza incorporando productos coadyuvantes de higiene oral que contengan agentes antimicrobianos (*Marsh, 2003*). Para comprender mejor los efectos clínicos que proporcionan estos agentes en el interior del B-PD es necesario aplicar una metodología en la que el biofilm crezca directamente en el interior de la cavidad oral y en la que su estructura tridimensional no se distorsione con la manipulación (*Wood et al, 2000; Beyth et al, 2010*). Sin embargo, hasta el momento se han publicado muy pocos trabajos en los que, aplicando CLSM y técnicas de viabilidad

bacteriana, se hayan evaluado los efectos de estos agentes antibacterianos sobre el B-PD *in vivo* en diferentes momentos post-exposición (Zaura-Arite *et al*, 2001; Arweiler *et al*, 2004; von Ohle *et al*, 2010). Los principios activos más utilizados en la actualidad incluyen: clorhexidina, combinaciones de aceites esenciales, triclosán, cloruro de cetilpiridinio, y varias sales metálicas como compuestos de zinc y fluoruro de estaño. De todos ellos, los colutorios de clorhexidina se consideran el “gold standard”, ya que son los que han demostrado mayor eficacia en estudios microbiológicos y clínicos (McDonnell y Russell, 1999; Tomás *et al*, 2008; von Ohle *et al*, 2010).

1.5.1. Efecto de la clorhexidina sobre modelos de biofilm de placa dental *in vitro*

Biofilm monoespecie

Millward y Wilson (Millward y Wilson, 1989) compararon los efectos de diferentes concentraciones de clorhexidina sobre *S. sanguis* en biofilm y en suspensión. Además de comprobar que a bajas concentraciones el efecto inhibitorio de la clorhexidina era transitorio, también demostraron que la CMI (concentración mínima inhibitoria) era mayor en las bacterias del biofilm y aumentaba a medida que éste iba madurando -lo que los autores imputaron a la agregación bacteriana-. Estos resultados fueron constatados posteriormente por otros autores (Larsen y Fiehn, 1995). Por el contrario, Pratten *et al* (Pratten *et al*, 1998b) estudiaron el efecto de las pulverizaciones de clorhexidina (0,05% y 0,2%) sobre biofilms de *S. sanguis* y en microcosmos de placa dental, no encontrando diferencias significativas en la viabilidad bacteriana en base a las distintas concentraciones del antiséptico, y sugiriendo que este resultado puede deberse a la naturaleza dinámica del sistema experimental empleado. Entre sus resultados más relevantes también señalaron la resistencia del biofilm a la acción del antiséptico -incapaz de eliminarlo después de 4 días de aplicación-, y la idoneidad de los

microcosmos de placa frente a los biofilms monoespecie, para reproducir la situación existente *in vivo*.

En un estudio publicado por Decker et al en 2003 (*Decker et al, 2003*), se comparó el efecto de la clorhexidina al 0,1% y del cloruro sódico sobre *S. sanguis* en forma planctónica y en biofilms generados sobre sustratos de vidrio y esmalte. Los resultados demostraron que la vitalidad bacteriana era menor en el B-PD conformado sobre el vidrio -lo que podría sugerir cierta influencia del sustrato- y, en contra de los hallazgos de estudios previos, una mayor susceptibilidad de las bacterias agregadas que de las planctónicas -según los autores porque el biofilm estaba en los estadios iniciales de formación-. Deng et al (*Deng et al, 2004*) también analizaron el efecto de varios sustratos (dentina bovina y poliacrilato) en biofilms de *S. mutans* tratados con clorhexidina al 0,2% durante 15 días; su resultado más relevante fue que la disminución de la viabilidad bacteriana fue más acusada en las muestras generadas sobre poliacrilato, confirmando que la naturaleza del sustrato afecta no sólo a la actividad metabólica sino también a la susceptibilidad de los biofilms a los antimicrobianos.

En 2008, Decker et al (*Decker et al, 2008*) volvieron a analizar el efecto de la clorhexidina, pero esta vez combinada con xilitol, frente al xilitol como agente puro. Para ello cuantificaron la viabilidad bacteriana en biofilms de *Streptococcus* spp. cariogénicos (*S. sanguis* y *S. mutans*). Los resultados de esta investigación demostraron que *S. mutans* era más susceptible a la clorhexidina que *S. sanguis* -que expresa resistencia natural-, y que la combinación de xilitol y clorhexidina tenía un efecto antimicrobiano significativo sobre los biofilms de *S. sanguis*, en comparación con el efecto producido por ambos agentes puros.

Numerosos autores han evaluado *in vitro* la actividad antimicrobiana de diferentes agentes químicos sobre un B-PD

monoespecie, empleando la clorhexidina como “gold standard” de referencia. A continuación se comentan los resultados de los trabajos más representativos. Wilson et al (*Wilson et al, 1996*) analizaron el efecto del cloruro de cetilpiridinio (0,05%) y de la clorhexidina (0,2%) en biofilms y formas planctónicas de *S. sanguis*, demostrando que la clorhexidina tenía mayor eficacia antimicrobiana. En 1997, Thrower et al (*Thrower et al, 1997*) estudiaron el efecto de 3 colutorios con triclosán, cloruro de cetilpiridinio y clorhexidina (0,12%) frente a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* en forma de biofilm o planctónica, concluyendo que la clorhexidina tenía mayor actividad y que la evaluación de colutorios antimicrobianos debía llevarse a cabo en bacterias que hayan crecido formando biofilms. En 1998, Pratten et al (*Pratten et al, 1998c*) estudiaron el efecto de esos 3 mismos colutorios sobre la viabilidad de biofilms de *S. sanguis*, formados sobre diferentes sustratos (hidroxiapatita, esmalte bovino y politetrafluoroetileno), demostrando que la mayor eficacia se obtenía con triclosán y clorhexidina, y que los resultados estaban condicionados por la naturaleza del sustrato. En 2005, Decker et al (*Decker et al, 2005*) analizaron el efecto del chitosán y la clorhexidina (0,1%) en la vitalidad de bacterias sésiles y planctónicas de *S. sanguis*, demostrando que la combinación de ambos agentes era más eficaz sobre las bacterias planctónicas que su aplicación por separado. Ese mismo año, Wirthlin et al (*Wirthlin et al, 2005*) compararon la eficacia de clorhexidina (0,12%) y dióxido de clorina (0,1%) sobre *S. sanguis* en biofilm y forma planctónica; la clorhexidina provocó una disminución significativa del número de bacterias viables, mientras que el efecto de la clorina no fue reseñable.

Biofilm multiespecie

Kinniment et al (*Kinniment et al, 1996b*) desarrollaron un método para evaluar agentes antimicrobianos sobre biofilms de 9 especies bacterianas creados en el CDFF. Después de comparar el efecto de diferentes concentraciones de clorhexidina (0,0125% y 0,125%),

concluyeron que la concentración más baja tenía un efecto limitado, mientras que con la más alta se obtuvo una inhibición diferencial y significativa.

En 1998, Pratten et al (*Pratten et al, 1998a*) publicaron un artículo en el que, después de crear biofilms compuestos por 6 especies bacterianas sobre discos de esmalte bovino utilizando el CDFF (con una composición similar a la de la placa supragingival), analizaron su susceptibilidad a la clorhexidina. Para ello expusieron las muestras a la acción del antiséptico al 0,2% durante 1, 5 y 60 minutos; posteriormente cuantificaron las bacterias supervivientes mediante cultivos y con la ayuda de la tinción LIVE/DEAD® BacLight™. La exposición a la clorhexidina durante 1 y 5 minutos no tuvo un efecto destacable en la viabilidad de ninguna de las 6 especies, mientras que la exposición durante 60 minutos produjo una mortalidad significativa, lo que, según los autores, demostraba la importancia de la sustantividad de los agentes antimicrobianos. Este mismo grupo (*Wilson et al, 1998*), aplicando una metodología similar, evaluó la repercusión de implementar los microcosmos de placa dental con un suplemento de sacarosa. El resultado más destacable fue que, a pesar de que se redujo el conteo de bacterias viables, numerosos microorganismos sobrevivieron a la exposición durante 1 minuto, mientras que sólo el 2-4% de la población bacteriana era viable después de 60 minutos de exposición a la clorhexidina.

Un año más tarde, Pratten y Wilson (*Pratten y Wilson, 1999*) repitieron el mismo diseño metodológico, para evaluar el efecto de 2 pulverizaciones diarias con gluconato de clorhexidina al 0,2% sobre la viabilidad y la composición de los microcosmos de placa. Los resultados demostraron que pasadas 120 horas desde la última pulverización aún existía una cierta reducción en el conteo total de bacterias, pero que después de 216 horas la población bacteriana superaba los niveles

basales. Otras conclusiones relevantes fueron que la proporción de especies presentes después de pulverizar fue diferente a la que existía previamente, y que las bacterias de los biofilms suplementados con sacarosa eran menos susceptibles a la acción de la clorhexidina, a pesar de que la pulverización afectó considerablemente a la composición y estructura de éstos.

Roberts et al (*Roberts et al, 2002*) cuantificaron el crecimiento del biofilm de *S. mutans* y *P. gingivalis* en la superficie de placas de microtitulación, y determinaron su CMI para clorhexidina. Mediante análisis microscópico comprobaron que el crecimiento de las dos especies era concluyente en la base de las placas, y que la morfología del biofilm de 6 días se caracterizaba por microcolonias bien definidas, huecos intersticiales y estructuras tipo “torre” de *S. mutans*; la CMI fue 1,25 mg mL⁻¹. Los autores recomendaron este sistema para generar biofilms reproducibles que permitan determinar su CMI frente a distintos agentes antimicrobianos.

Hope y Wilson (*Hope y Wilson, 2004*) volvieron a aplicar el CDFF y la tinción LIVE/DEAD[®] BacLight[™] para analizar los efectos de la clorhexidina sobre microcosmos de placa dental, esta vez en relación con cambios en los perfiles de viabilidad. La diferencia con sus trabajos previos fue el empleo del microscopio confocal, el sustrato con discos de hidroxiapatita y que, en vez de confrontar diferentes tiempos de aplicación del antiséptico, se comparó el efecto de distintas concentraciones (0,05% y 0,2%). Las conclusiones más sobresalientes de este trabajo fueron las siguientes: las capas superficiales estaban compuestas primordialmente por bacterias viables y las más profundas por no viables; se produjeron menos cambios en el perfil de viabilidad con la clorhexidina a menor concentración; los efectos bactericidas se detectaron a los 3-5 minutos después de la exposición, lo que nuevamente parece confirmar que los biofilms bacterianos orales son

intrínsecamente menos susceptibles a los efectos del agente antimicrobiano que sus equivalentes planctónicos; la clorhexidina produjo una cierta contracción del biofilm. Esta última conclusión fue posiblemente la más novedosa y los autores la achacaron a las interacciones iónicas entre las cargas negativas de la matriz de exopolisacáridos y las positivas de las moléculas del antiséptico. Dichas interacciones podrían cambiar las propiedades físico-químicas de la matriz, que se vuelve más compacta, inhibiendo la difusión de solutos, pero paradójicamente los canales de agua que se abren podrían facilitar el transporte del agente antimicrobiano hasta las regiones más internas del biofilm. Este efecto de la contracción del biofilm parece estar relacionado con la concentración de la clorhexidina y aún no se ha explicado definitivamente.

La clorhexidina también se ha utilizado como patrón de referencia para evaluar *in vitro* la eficacia antibacteriana de otros agentes químicos sobre biofilms multiespecie. En 2001, Guggenheim et al (*Guggenheim et al, 2001a*) desarrollaron y validaron un modelo de placa supragingival, constituido por 5 especies bacterianas que colonizaban discos de hidroxiapatita. Aplicando la tinción LIVE/DEAD® BacLight™, técnicas convencionales de cultivo y microscopía confocal, cuantificaron la eficacia del digluconato de clorhexidina y del triclosán. El efecto antibacteriano del triclosán fue menor y la respuesta a la clorhexidina resultó dosis-dependiente (la clorhexidina al 0,2% redujo la viabilidad del biofilm hasta el 0%). Un año después, Shapiro et al (*Shapiro et al, 2002*) también demostraron la utilidad de un modelo de biofilm *in vitro* para evaluar preclínicamente soluciones antisépticas orales, aunque en este caso ensayaron 12 colutorios diferentes. El biofilm lo componían 5 especies bacterianas (en algún caso también *Candida albicans*) y se formó sobre discos de hidroxiapatita. Sus resultados demostraron que la incorporación del hongo no condicionaba la eficacia de la clorhexidina y que los compuestos de origen botánico así como los fenólicos, eran

menos efectivos que la mayoría de los que contenían clorhexidina, hexetidina u octenidina.

Más recientemente, Filoche et al (*Filoche et al, 2007*) realizaron un ensayo de fluorescencia para cuantificar la biomasa total viable de los microcosmos de placa generados en una boca artificial, bajo distintas condiciones de crecimiento y tras su exposición a varios antisépticos orales. Los resultados demostraron que la viabilidad de las muestras de 3 días tratadas con clorhexidina o aceites esenciales no se afectaba, y que las expuestas al antiséptico desde el día 0 se recuperaban completamente 14 días post-tratamiento. En consecuencia, los autores sugirieron que la clorhexidina no tiene efecto a largo plazo en términos de viabilidad, aunque sí en la reducción de la biomasa. Por último, Takenaka et al (*Takenaka et al, 2008*) también desarrollaron un método para analizar la acción de un agente antimicrobiano dentro del biofilm, describiendo los patrones espaciales y temporales de la actividad de dichos antisépticos. El biofilm lo componían 3 especies bacterianas y se analizó con microscopía confocal. Los antimicrobianos con formulación a base de enzimas provocaban una pérdida de fluorescencia gradual, lenta y continua, mientras que el patrón de la clorhexidina era diferente, ya que la pérdida de fluorescencia comenzaba en la periferia de los grupos celulares y posteriormente progresaba hacia el interior. Los autores concluyeron que la información espacial de los biofilms es importante, ya que presentan una gran heterogeneidad estructural y fisiológica.

1.5.2. Efecto de la clorhexidina sobre modelos de biofilm de placa dental *in vivo*

A pesar de la gran cantidad de información disponible sobre la actividad antimicrobiana de la clorhexidina en el biofilm, hasta la fecha sólo se han publicado dos trabajos en los que se investigó *in vivo* el efecto de una única aplicación de éste antiséptico sobre el B-PD. Sin embargo, en

ambos estudios las muestras fueron tratadas y procesadas *ex vivo*, lo que los autores justificaron argumentando que esta metodología evitaba factores individuales como el empleo de colutorios, el flujo salival y otras propiedades de la saliva, así como sesgos inherentes al efecto de arrastre del antimicrobiano entre diferentes muestras y sus respectivos controles. En definitiva, el diseño metodológico *ex vivo*, permite comparar muestras generadas durante el mismo período experimental bajo condiciones similares (Zaura-Arite *et al*, 2001).

En 2001, Zaura-Arite *et al* (Zaura-Arite *et al*, 2001) fueron los primeros autores que cuantificaron el efecto antimicrobiano de una única aplicación *ex vivo* de clorhexidina en muestras de B-PD formadas *in vivo* sobre discos de dentina bovina. Los discos fueron removidos a las 6 horas, 1 y 2 días, y divididos en dos mitades a través de una ranura central. Una de las mitades se recubrió durante 1 minuto con 50 μ L de digluconato de clorhexidina al 0,2%, mientras que la otra se sumergió en suero salino y se utilizó como control. Aunque hubo importantes diferencias inter-individuales, los autores señalaron que en el B-PD con menos de 65 μ m de grosor el efecto bactericida del antiséptico fue pequeño y superficial. Los valores medios de vitalidad bacteriana en los discos de control y los tratados con clorhexidina fueron: a las 6 horas, 35% *versus* 18%; en las muestras de 1 día, 49% *versus* 34% en la capa más externa, 67% *versus* 42% en la media, y 50% *versus* 48% en la capa interna; y en las muestras de 2 días, 52% *versus* 33% en la capa externa, 63% *versus* 42% en la media, y 54% *versus* 48% en la interna. Durante el período del experimento, los participantes mantuvieron su dieta habitual y llevaron un aparato removible intraoral portadiscos, que sólo retiraban 2 veces al día para cepillarse los dientes. Cabe señalar que el cepillado se efectuó con pasta dentífrica con fluoruro sódico, lo que probablemente pudo condicionar los resultados (Zaura-Arite, *et al*, 2001).

Recientemente, von Ohle et al (*von Ohle et al, 2010*) analizaron el efecto de la clorhexidina sobre la fisiología del B-PD suplementado con sacarosa, exponiendo *ex vivo* las muestras del biofilm durante 1 y 10 minutos a 10 mL de una solución de este antiséptico al 0,2%. En contra de los resultados obtenidos por Zaura-Arite (*Zaura-Arite et al, 2001*), la clorhexidina redujo significativamente la vitalidad bacteriana (67% en el B-PD control frente a 2% y 0,7% en las muestras expuestas al antiséptico durante 1 y 10 minutos, respectivamente). Sin embargo, la clorhexidina no condicionó significativamente el metabolismo oxidativo, puesto que tras 10 minutos de exposición el biofilm todavía era fisiológicamente activo, lo que evidenciaba una aniquilación bacteriana incompleta y una readaptación funcional de las capas más profundas del biofilm. Un aspecto particularmente relevante de las aportaciones de estos autores fue que, si bien la viabilidad bacteriana tras 1 minuto de exposición estimada con la tinción LIVE/DEAD® BacLight™ fue del 2%, en un cultivo convencional fue del 58%, lo que permite asumir que tras exposiciones cortas algunas bacterias persisten cultivables aun cuando tengan sus membranas dañadas. Sin embargo, tras 10 minutos de exposición, el número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC)/mL se redujo significativamente en comparación con el obtenido en el B-PD control.

Por otra parte, von Ohle et al (*von Ohle et al, 2010*) también aplicaron un modelo de difusión simple para calcular la concentración de clorhexidina en función del tiempo de exposición y la profundidad que alcanza en el grosor del biofilm. Los autores asumieron que una concentración de clorhexidina al 0,1% debería ser clínicamente relevante en base a los siguientes argumentos: los valores de CMI de diferentes bacterias orales proporcionados por varios autores (rango 8-500 mg/l) (*Stanley et al, 1989*); los valores de CIB (concentración de inhibición del biofilm) de *Streptococcus sanguis* fueron hasta 500 veces superiores a los de la CMI (*Larsen y Fiehn, 1996*); y la verificación

mediante microscopía electrónica del daño infringido a las membranas celulares (*Vitkov et al, 2005*). Aplicando una solución de clorhexina al 0,2% durante 1 minuto, estimaron que las concentraciones de 0,1% o mayores sólo se obtenían a profundidades inferiores a 70 μm . El modelo predice que el antiséptico necesitaría 17,5 minutos para llegar a detectarse una concentración de clorhexidina del 0,1% en la base de un biofilm de 300 μm de grosor (como ocurre en los espacios interproximales u otras áreas retentivas). Sin embargo, si el grosor del B-PD se reduce a 100 μm , el tiempo necesario para que el antiséptico alcance la base del biofilm en concentraciones del 0,1% se reduce a 2 minutos, y a 12 segundos cuando el B-PD no supera las 30 μm . En base a estas observaciones, estos autores concluyeron que es imperativo reducir el grosor del biofilm con medios mecánicos antes de exponerlo al antiséptico y que es improbable que el control del B-PD pueda efectuarse exclusivamente utilizando colutorios.

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Esta Tesis doctoral se gestó tras mi incorporación al grupo de investigación 1326 de la Universidad de Santiago de Compostela, que dirige la Dra. Inmaculada Tomás, entre cuyas líneas de trabajo prioritarias se incluía el análisis de la actividad antimicrobiana de determinados antisépticos orales como la clorhexidina (CHX). Inicialmente recurrimos a la cuantificación de colonias bacterianas en muestras de saliva cultivadas en placas convencionales y corroboramos la influencia de la concentración del antiséptico sobre su actividad antibacteriana, especialmente sobre la flora anaerobia estricta (Tomás *et al*, 2008). Aunque ésta era una metodología reconocida por la comunidad científica, algunos autores cuestionaron su fiabilidad y propusieron como alternativa las técnicas de fluorescencia, empleando fluorocromos específicos para el marcaje de bacterias viables y no viables, en base a la integridad de la membrana citoplasmática. En consecuencia, planteamos un primer

Objetivo:

Evaluar la actividad antimicrobiana *in vivo* de la CHX sobre la flora salival hasta 7 horas después de su utilización, aplicando una técnica de microscopía de epifluorescencia.

Como los resultados obtenidos con ésta técnica (incorporando la solución LIVE/DEAD® BacLight™) demostraron que era eficaz para cuantificar en “tiempo real” la viabilidad bacteriana de la flora salival, decidimos investigar qué factores podían condicionar la potencia antimicrobiana del antiséptico. Primero analizamos la forma de administración de la CHX y comprobamos que los mejores resultados los proporcionaba un enjuague (frente a un gel, un spray y la aplicación del colutorio con una gasa) (García-Caballero *et al*, 2009). Después contrastamos una serie de factores intrínsecos -como la concentración de la CHX, el volumen aplicado y la duración del enjuague- y

extrínsecos -como comer, beber o masticar un chicle-, confirmando que la sustentividad del antiséptico no sólo estaba condicionada por su concentración, sino también por otros factores como la duración del enjuague o la práctica de determinadas actividades cotidianas (*Tomás et al, 2010a*).

Estos resultados podrían contribuir a optimizar los protocolos de administración de antisépticos, especialmente en situaciones clínicas en las que se persigue una reducción significativa de la carga bacteriana durante un corto período de tiempo, como la prevención de complicaciones infecciosas tras un procedimiento odontológico.

La idea de aplicar un antiséptico con fines profilácticos, exigía analizar su eficacia antimicrobiana en otros ecosistemas orales, particularmente en los que presentan características estructurales y fisiológicas diferentes a la saliva, como es el caso de la placa dental, cuyo interés aumenta si consideramos su papel primordial en el desarrollo de la caries y la enfermedad periodontal. Por ello, planteamos un segundo

Objetivo:

Analizar el efecto *in situ* de un enjuague de CHX sobre la viabilidad de las bacterias que conforman la placa dental, comparando los resultados con los obtenidos en la flora salival. Aunque utilizamos nuevamente la técnica de epifluorescencia en las muestras salivales, para poder estudiar íntegramente este biofilm sin desestructurarlo ni alterar su arquitectura, recurrimos al microscopio de barrido láser confocal.

Por último, y dado que ya conocíamos las particularidades del comportamiento de la CHX en la saliva y la placa dental, intentamos

analizar nuevas variables -como la sustentividad a largo plazo y la influencia del ritmo circadiano- que también podrían condicionar la posología del antiséptico. Con esta finalidad planteamos un tercer

Objetivo:

Evaluar la viabilidad bacteriana de la flora salival y de la placa dental hasta 12 horas después de la aplicación de un único enjuague de CHX, teniendo en cuenta el momento del día en el que se administra el antiséptico.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. SELECCIÓN DEL GRUPO DE ESTUDIO

El grupo de estudio lo conformaron 40 voluntarios adultos con edades comprendidas entre 20 y 45 años que presentaban un buen estado de salud oral: mínimo de 24 dientes permanentes explorables, sin evidencia de gingivitis ni periodontitis (*Community Periodontal Index score*= 0) (*World Health Organization, 1997*), y ausencia de caries. Los criterios de exclusión aplicados fueron: fumar, ser portador de prótesis dentales o aparatos ortodóncicos, haber recibido antibióticos o utilizar de forma rutinaria antisépticos orales durante los últimos 3 meses, y padecer alguna enfermedad sistémica que provoque una alteración en la producción y/o composición de la saliva. Previamente al inicio del estudio, a todos los voluntarios se les efectuó una tartrectomía. En todos los casos se obtuvo por escrito el consentimiento informado de los participantes en el estudio. Este proyecto fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Santiago de Compostela.

3.2. EVALUACIÓN DE LA SUSTANTIVIDAD DE LA CLORHEXIDINA SOBRE LA FLORA SALIVAL APLICANDO MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA

3.2.1. Recogida de muestras salivales

De 15 participantes del grupo de estudio se recogieron muestras de saliva no estimulada (1 mL) en condiciones basales, y a los 30 segundos, 1, 3, 5 y 7 horas, después de realizar bajo supervisión:

- 1) Un único enjuague de 10 mL durante 30 segundos de agua estéril (control negativo) (UE-agua).
- 2) Un único enjuague de 10 mL durante 30 segundos con CHX al 0,2% en solución acuosa (Oraldine Perio®, Johnson & Johnson, Madrid, España) (UE-CHX 0,2%).

Los participantes no practicaron ninguna técnica de higiene oral desde la noche anterior al experimento. El día de la prueba, se les prohibió ingerir alimentos o bebidas desde 1 hora antes de la primera recogida de saliva y durante el transcurso del experimento. La recogida de muestras salivales se efectuó entre las 11:50 de la mañana (muestra basal) y las 7 de la tarde (última muestra recogida 7 horas después de concluir el enjuague). Aplicando un sistema de aleatorización equilibrada, todos los voluntarios efectuaron los 2 enjuagues, estableciéndose un “período de descanso” de 2 semanas entre las diferentes aplicaciones. Las muestras de saliva no estimulada se recogieron aplicando métodos previamente descritos (“spitting method”) (Navazesh y Christensen, 1982).

3.2.2. Procesamiento y análisis de las muestras salivales

La solución de fluorescencia LIVE/DEAD® BacLight™ (Molecular Probes, Leiden, Holanda) compuesta por SYTO-9 y yoduro de propidio se preparó siguiendo las recomendaciones del fabricante en 5 mL de agua esterilizada y filtrada usando un filtro de membrana Millipore de 0,22 μm (Millipore Ibérica S.A., Madrid, España), alcanzando una proporción 1:1 de ambos fluorocromos y se conservó a -20°C . Las muestras de saliva se centrifugaron a 2000 rpm durante 6 minutos. El sobrenadante se desechó y el *pellet* obtenido fue resuspendido en 100 μL de agua estéril. Después de agitar la suspensión bacteriana para homogeneizarla, se mezcló con 100 μL de la solución de fluorescencia y se almacenó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 15 minutos. La tinción dual, compuesta por SYTO 9 y yoduro de propidio, permite diferenciar las bacterias que tienen sus membranas citoplasmáticas intactas de aquéllas que presentan las membranas dañadas, ya que las primeras emiten fluorescencia verde y las dañadas fluorescencia roja, como se muestra en la Figura 7. La observación microscópica la realizaron 2 investigadores que desconocían el diseño del estudio, empleando un microscopio Olympus BX51 (Olympus,

Tokio, Japón) equipado con un set de filtros para fluoresceína y Texas Red. Las longitudes de onda de excitación (rango de emisión) para el SYTO 9 y el yoduro de propidio son 488 nm (492-550 nm) y 561 nm (588-655 nm) respectivamente.

El conteaje de bacterias viables y no-viables se realizó a gran aumento (100x) en 20 campos microscópicos (10 campos por portaobjetos) que presentaban un mínimo de 100 bacterias y se excluyeron los agregados bacterianos (Figura 8). Se calculó el porcentaje medio de viabilidad bacteriana de cada muestra salival y a la diferencia en el porcentaje de bacterias viables entre 2 muestras salivales se le denominó “Reducción de la Viabilidad” (RV). Los valores positivos de RV representan un descenso de la vitalidad bacteriana y los valores negativos de RV un incremento de la vitalidad bacteriana.

Simultáneamente, para contrastar los resultados obtenidos con la microscopía de epifluorescencia *versus* cultivos en placa, en 5 participantes se recogieron muestras de saliva no estimulada (2 mL) en condiciones basales, y a los 30 segundos, 1, 3, 5 y 7 horas después de realizar el UE-CHX 0,2%. Se efectuaron diluciones seriadas y las muestras resultantes se cultivaron y subcultivaron en medios de cultivo convencionales para el aislamiento de bacterias aerobias, anaerobias facultativas y anaerobias estrictas, tal y como se describió previamente (Tomás *et al*, 2008). Se determinó el número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC)/mL y los resultados se expresaron en logaritmos decimales (\log_{10} UFC/mL).

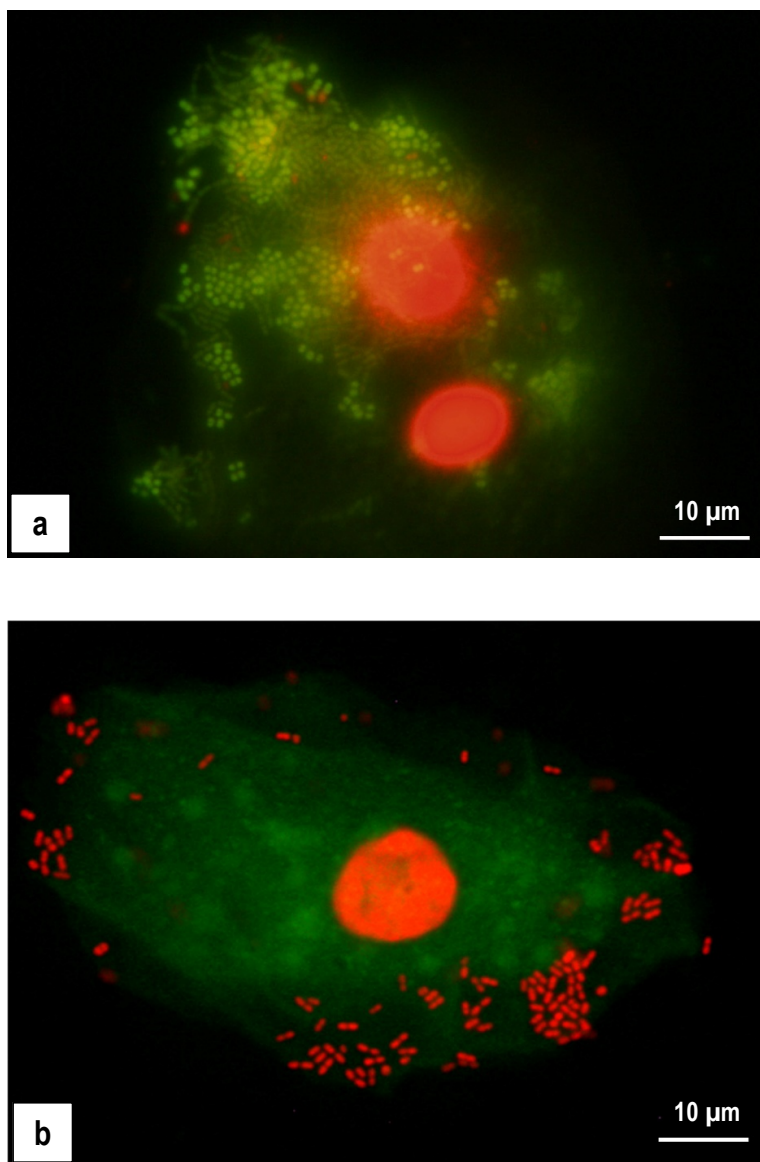


Figura 7. Bacterias de la flora salival sobre células epiteliales (objetivo 100x).
a) Con predominio de membranas intactas (emitiendo fluorescencia verde).
b) Con predominio de membranas dañadas (emitiendo fluorescencia roja).

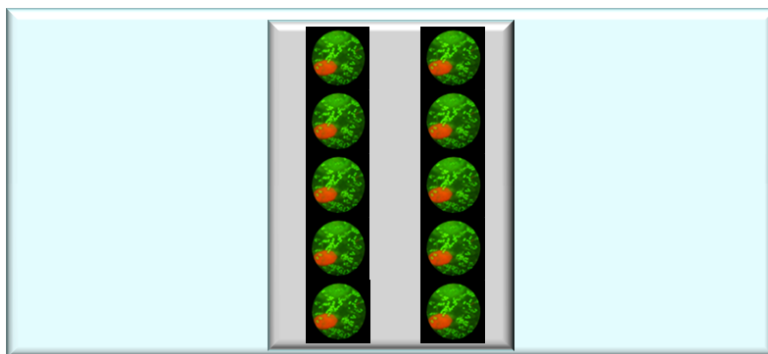


Figura 8. El conteaje de bacterias viables y no-viables se realizó en 20 campos microscópicos (10 campos por cada portaobjetos) que presentaban un mínimo de 100 bacterias.

3.3. EVALUACIÓN DE LA SUSTANTIVIDAD DE LA CLORHEXIDINA SOBRE LA FLORA SALIVAL Y EL BIOFILM DE PLACA DENTAL

3.3.1. Confección de una férula porta-discos individualizada

A 15 participantes del grupo de estudio se les confeccionó una férula individualizada de la arcada inferior para albergar 6 discos de cristal (6 mm de diámetro, 1 mm de grosor) pulidos a 4000 grid. Esta férula consta de 2 planchas de vinilo. La interna tiene 1 mm de grosor y es la que proporciona retención y soporta los discos, mientras que la externa es de 0,5 mm de grosor y está fenestrada para permitir el contacto de la superficie vestibular de los discos con la saliva, a la vez que éstos se encuentran protegidos de la acción de las mejillas y la lengua (Figura 9a). Se colocaron 3 discos en una hemiarcada y los 3 restantes en la contralateral. El disco 1 o anterior se colocó entre la porción distal del canino y la mesial del primer premolar; el disco 2 o medio entre la distal del segundo premolar y la mesial del primer molar; el disco 3 o posterior entre la distal del primer molar y la mesial del segundo molar (Figura 9b).

Durante 48 horas, cada voluntario portó la férula con los discos de cristal para favorecer el crecimiento del biofilm bacteriano (Figura 9c), retirándola de la cavidad oral únicamente durante las comidas (tiempo durante el cual la férula permanecía en una solución salina fisiológica estéril) y para efectuar maniobras de higiene oral (basadas exclusivamente en la remoción mecánica de la placa bacteriana sin el empleo de ninguna pasta dentífrica o colutorio).

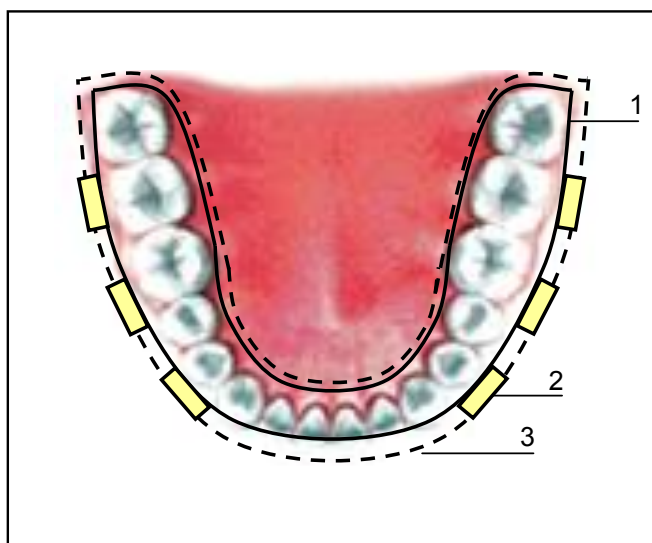


Figura 9a. Diseño de la férula doble porta-discos de cristal.

1- Férula interna en contacto con la arcada dentaria inferior.

2- Disco de cristal.

3- Férula externa fenestrada en el área de los discos.

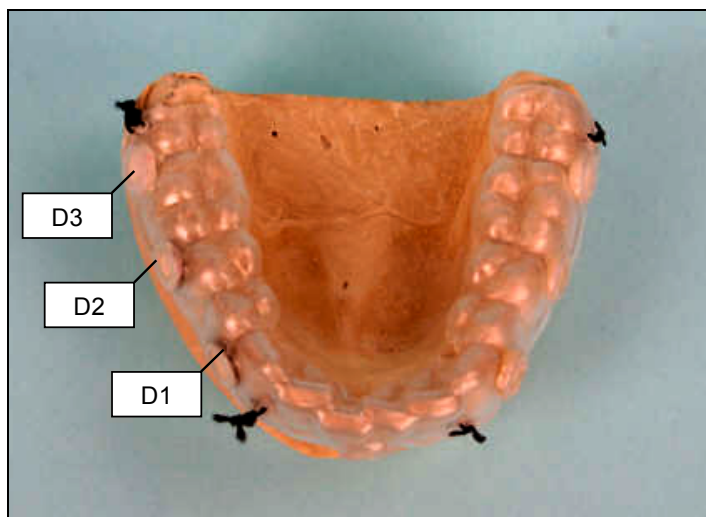


Figura 9b. Imagen de la férula porta-discos individualizada.

D1 (Disco 1): Colocado entre la porción distal del canino y la mesial del primer premolar.

D2 (Disco 2): Colocado entre la porción distal del segundo premolar y la mesial del primer molar.

D3 (Disco 3): Colocado entre la porción distal del primer molar y la mesial del segundo molar.



Figura 9c. Imagen clínica de la férula porta-discos.

3.3.2. Recogida de muestras de saliva y biofilm de placa dental

De cada uno de los voluntarios se recogieron muestras de saliva no estimulada (1 mL) en condiciones basales, y a los 30 segundos, 1, 3, 5 y 7 horas, después de realizar bajo supervisión un único enjuague de 10 mL durante 30 segundos con CHX al 0,2% en solución acuosa (Oraldine Perio[®], Johnson & Johnson, Madrid, España).

Después de aplicar un período de lavado de 2 semanas y transcurrido el preceptivo período de 48 horas, en el que los participantes llevaban la férula y aplicaban las instrucciones de higiene oral que hemos descrito, los voluntarios repitieron un único enjuague de 10 mL durante 30 segundos con CHX al 0,2% en solución acuosa (Oraldine Perio[®]). Igualmente, se recogieron muestras en condiciones basales, a los 30 segundos, 1, 3, 5, y 7 horas. En cada toma se retiró un disco de vidrio de la férula, alternado los de la hemiarcada derecha con los de la izquierda y siempre en dirección disto-mesial.

Los participantes no practicaron ninguna técnica de higiene oral desde la noche anterior al experimento. El día de la prueba, se les prohibió ingerir alimentos o bebidas desde 1 hora antes de la primera recogida de saliva y durante el transcurso del experimento. La recogida de muestras se efectuó entre las 11:50 de la mañana (muestra basal) y las 7 de la tarde (última muestra recogida 7 horas después de concluir el enjuague).

Para establecer un grupo de control negativo, tras un período de lavado de 2 semanas, todos los voluntarios repitieron ambos experimentos aplicando el mismo protocolo, pero sustituyendo el enjuague de CHX por agua estéril destilada.

3.3.3. Procesamiento y análisis de las muestras de saliva y biofilm de placa dental

Las muestras de saliva se procesaron y analizaron siguiendo el protocolo que se detalla en el apartado 3.2.2.

Con respecto a las muestras de biofilm de placa dental, a medida que los discos de cristal se retiraban de la férula, inmediatamente eran sumergidos en 100 μ L de la solución de fluorescencia LIVE/DEAD® BacLight™ y almacenados en la oscuridad a temperatura ambiente durante 15 minutos. La observación microscópica la realizó un único investigador que desconocía el diseño del estudio, empleando un microscopio Láser Confocal Espectral Leica TCS SP2 (Leica Microsystems HeidelberGmbH, Mannheim, Alemania) y el objetivo HCX APO L 63x/0,9 de inmersión en agua (Figura 10).

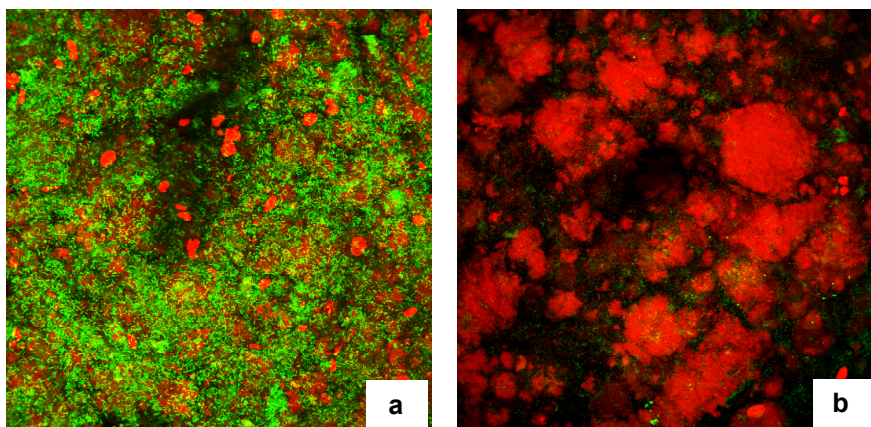


Figura 10. Muestra de biofilm de placa dental (objetivo HCX APO L 63x/0,9 de inmersión en agua). **a)** Con predominio de membranas intactas (emitiendo fluorescencia verde). **b)** Con predominio de membranas dañadas (emitiendo fluorescencia roja).

En la parte central de cada disco se evaluaron 4 campos o series x-y-z seleccionados aleatoriamente. La emisión de fluorescencia se determinó en series de imágenes x-y, en las que cada imagen se

correspondió con cada una de las posiciones en z (en profundidad). Las secciones ópticas son escaneadas en secciones de 1 μ m desde la superficie del biofilm hasta la base del mismo, determinándose el grosor máximo del campo y posteriormente el grosor máximo del biofilm de la correspondiente muestra.

Al igual que en trabajos publicados por otros autores (*Roberts et al, 1999*), se definió el grosor máximo de cada campo de biofilm como la distancia existente entre el sustrato y los picos de los grupos bacterianos más altos. La diferencia de grosor entre dos muestras de biofilm se denominó “Reducción del grosor” (RG). Los valores positivos representan una disminución del grosor de biofilm y los valores negativos significan un incremento del grosor de biofilm. El grosor máximo de biofilm de cada campo se dividió en tres zonas o capas equivalentes: capa 1 o capa interna, capa 2 o capa intermedia, capa 3 o capa externa. En el punto medio de cada capa se cuantificó, en términos de porcentaje, la presencia o ausencia de las siguientes características estructurales: modelo de arquitectura abierta y heterogénea, canales rellenos de fluido y estructuras tipo “burbuja”. Para ello, aplicamos la descripción de estas características estructurales del biofilm aportadas por otros autores (*Wood et al, 2000; Auschill et al, 2001; Zaura-Arite et al, 2001; Arweiler et al, 2004; Auschill et al, 2004*).

La cuantificación de la viabilidad bacteriana en series de imágenes x-y se determinó mediante el análisis del citofluorograma (Leica Confocal Software) (Figura 11).

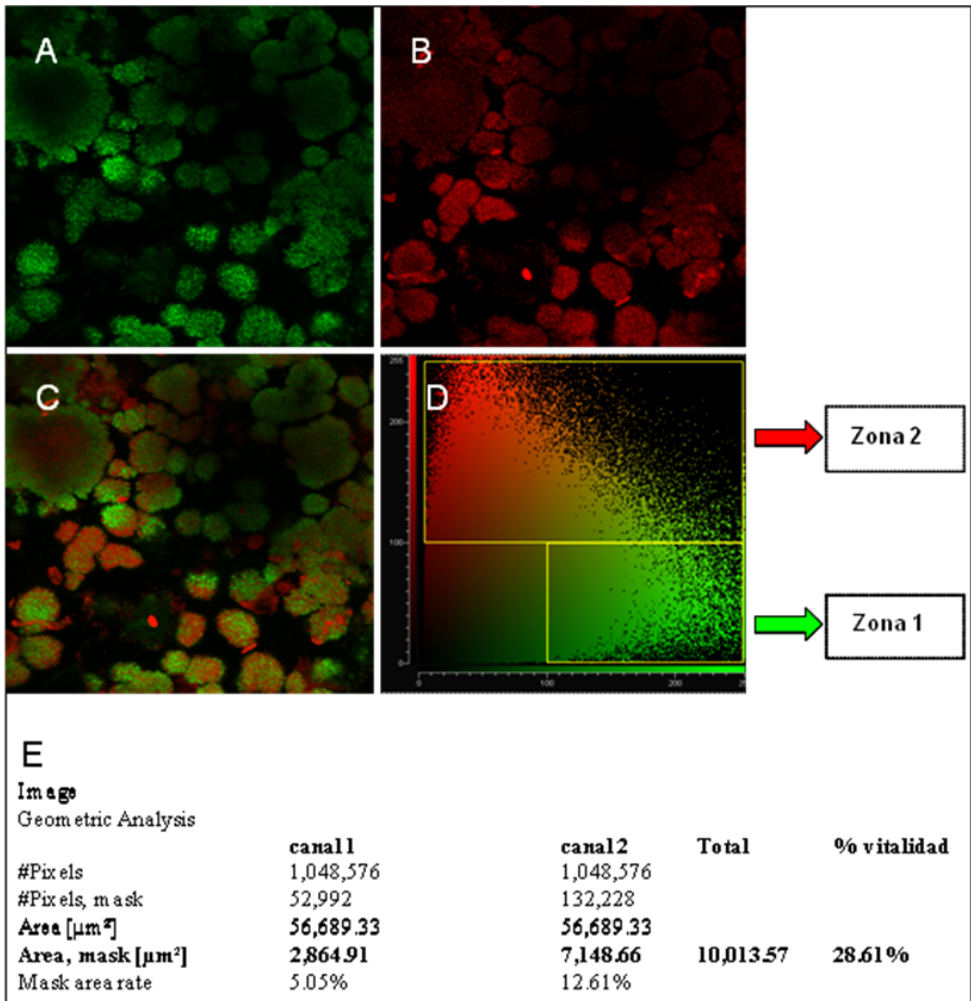


Figura 11. Cuantificación de la viabilidad bacteriana analizando la emisión de fluorescencia en secciones de los ejes X-Y correspondientes a diferentes posiciones de Z (profundidad). A) Canal verde (muestra las membranas citoplasmáticas intactas); B) Canal rojo (muestra las membranas dañadas); C) Superposición de los canales verde y rojo; D) Fluorograma y segmentación; E) Cuantificación automática de los datos de una sección (p. ej., viabilidad bacteriana= 28,61%).

En este análisis las imágenes de cada fluorocromo se describen como “canales” (SYTO 9 ocupa el “canal verde” y YP el “canal rojo”), obteniéndose valores de área (μm^2) ocupada por cada canal, el área total ocupada por biofilm y el correspondiente porcentaje de viabilidad (Figura 11). Para el cálculo del porcentaje medio de viabilidad

bacteriana de cada campo se incluyeron las secciones con un área mínima de biofilm de $250 \mu\text{m}^2$ y posteriormente se determinó el porcentaje medio de viabilidad bacteriana del biofilm de la correspondiente muestra y de cada una de sus capas. A la diferencia en el porcentaje de bacterias viables entre 2 muestras de biofilm se le denominó “Reducción de la Viabilidad” (RV). Los valores positivos de RV representan un descenso en la vitalidad bacteriana y los valores negativos de RV un incremento de la vitalidad bacteriana.

3.4. INFLUENCIA DEL RITMO CIRCADIANO EN LA SUSTANTIVIDAD DE LA CLORHEXIDINA SOBRE LA FLORA SALIVAL Y EL BIOFILM DE PLACA DENTAL

3.4.1. Recogida y procesamiento de muestras de saliva y biofilm de placa dental

Este experimento se realizó en 10 componentes del grupo de estudio. Transcurrido el preceptivo período de 48 horas en el que los participantes llevaban la férula (confeccionada según se detalla en el apartado 3.3.1.) y aplicaban las instrucciones de higiene oral que hemos descrito, de cada uno de ellos se recogieron muestras de saliva no estimulada (1 mL) y se retiraron 2 discos de cristal de la férula (en cada toma se retiró un disco de la hemiarcada derecha y otro de la izquierda, siempre en dirección disto-mesial) a las 8, 10 y 12 horas, después de realizar bajo supervisión:

- 1) Un único enjuague de 10 mL durante 30 segundos con CHX al 0,2% (Oraldine Perio®) a las 7 de la mañana (ENJ-CHX-diurno).
- 2) Un único enjuague de 10 mL durante 30 segundos con CHX al 0,2% (Oraldine Perio®) a la 1 de la mañana (ENJ-CHX-nocturno).

El día del experimento, a los voluntarios se les prohibió ingerir alimentos o bebidas durante su transcurso. La recogida de las

diferentes muestras salivales y del B-PD se realizaron: después del ENJ-CHX-diurno, desde las 3 de la tarde (muestra de las 8 horas post-enjuague) hasta las 7 de la tarde (muestra de las 12 horas post-enjuague); después del ENJ-CHX-nocturno, desde las 9 de la mañana (muestra de las 8 horas post-enjuague) hasta la 1 de la tarde (muestra de las 12 horas post-enjuague). Aplicando un sistema de aleatorización equilibrada, todos los participantes efectuaron los 2 enjuagues, estableciéndose un “período de descanso” de 2 semanas entre las diferentes aplicaciones.

A continuación, las muestras de saliva se procesaron siguiendo el protocolo que se detalla en el apartado 3.2.2. y las de B-PD en el apartado 3.3.3.

Para establecer un grupo de control negativo, tras un período de lavado de 2 semanas todos los voluntarios repitieron el experimento aplicando el mismo protocolo, pero sustituyendo el enjuague de CHX por agua estéril destilada.

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

3.5.1. Evaluación de la sustantividad de la clorhexidina sobre la flora salival aplicando microscopía de epifluorescencia

Los resultados se analizaron con el programa estadístico SPSS versión 15.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, EE.UU.). Se determinó el coeficiente de correlación intraclase (modelo de 2 factores, efectos aleatorios) para obtener el grado de consistencia o acuerdo intra- e inter-examinador en el conteo de bacterias viables y no-viables y el grado de homogeneidad de los elementos mediante la perspectiva de “acuerdo absoluto”. Los datos sobre viabilidad bacteriana de la flora salival fueron expresados como media y desviación típica de la media. La elección de un test paramétrico o no paramétrico dependió del tipo de distribución de los valores de la variable cuantitativa analizada

(“porcentaje de viabilidad bacteriana”), que se determinó aplicando el test Kolmogorov-Smirnov. Todas las variables cuantitativas analizadas mostraron una distribución normal. Se aplicó el test de ANOVA para medidas repetidas para el análisis de comparaciones intra- e inter-enjuague de todas las muestras salivales, y los contrastes simples para el análisis de comparaciones intra- e inter-enjuague entre 2 muestras salivales. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$.

3.5.2. Evaluación de la sustantividad de la clorhexidina sobre la flora salival y el biofilm de placa dental

Los resultados fueron analizados utilizando el programa estadístico PASW® Statistics Base 18 para Windows (IBM, Madrid, Spain). Se determinó el coeficiente de correlación intraclase (modelo de 2 factores, efectos aleatorios) para obtener el grado de consistencia intra- e inter-examinador en las muestras de saliva y el grado de homogeneidad de los elementos mediante la perspectiva de “acuerdo absoluto”. Los test de Friedman y Wilcoxon se emplearon para comparar la presencia de diferentes características estructurales dentro de las 3 capas de B-PD (en términos de porcentaje). Los datos sobre los grosores y vitalidad bacteriana de los B-PD fueron expresados como media y desviación típica de la media. Los valores de las variables cuantitativas analizadas (“grosor del biofilm” y “porcentaje de viabilidad bacteriana”) mostraron una distribución normal; que se determinó aplicando el test Kolmogorov-Smirnov. Se aplicó el test de ANOVA (modelo de 1 factor con medidas repetidas) para las comparaciones intra-enjuague utilizando todas las muestras de saliva y de biofilm de placa dental. Se utilizó el test ANOVA (modelo de 2 factores, ambos con medidas repetidas), para las comparaciones intra-enjuague (diferenciando entre las 3 capas de biofilm), inter-enjuague e inter-ecosistema empleando todas las muestras de saliva y de biofilm de placa dental. El test ANOVA (modelo de 3 factores, todos con medidas repetidas) se aplicó

para las comparaciones inter-enjuague (diferenciando entre las 3 capas de biofilm) utilizando todas las muestras de biofilm de placa dental. Se efectuaron comparaciones por pares (con el ajuste de Bonferroni) para el análisis intra- e inter-enjuague (incluyendo la diferenciación entre las 3 capas de biofilm), así como comparaciones inter-ecosistema entre 2 muestras de saliva y biofilm. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$.

3.5.3. Influencia del ritmo circadiano en la sustantividad de la clorhexidina sobre la flora salival y el biofilm de placa dental

Los resultados se analizaron con el programa estadístico PASW® Statistics Base 18 para Windows (IBM, Madrid, Spain). Para el análisis intra- e inter-observador, en la técnica de microscopía de epifluorescencia se determinó el coeficiente de correlación intraclase (modelo de 2 factores, efectos aleatorios) y el grado de homogeneidad de los elementos mediante la perspectiva “acuerdo absoluto”.

Los datos sobre los grosores y vitalidad bacteriana de los biofilms de placa dental fueron expresados como media y desviación típica de la media. Los valores de las variables cuantitativas analizadas (“grosor del biofilm” y “porcentaje de viabilidad bacteriana”) mostraron una distribución normal, que se determinó aplicando el test Kolmogorov-Smirnov. Se aplicó el test de ANOVA (modelo de 2 factores, ambos con medidas repetidas) y se efectuaron comparaciones por pares (con el ajuste de Bonferroni) para el análisis intra- e inter-enjuague del grosor del biofilm y de la viabilidad bacteriana en la flora salival y B-PD, así como el análisis de la viabilidad en cada tipo de enjuague (ENJ-CHX-diurno y ENJ-CHX-nocturno) entre ambos ecosistemas orales. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. EVALUACIÓN DE LA SUSTANTIVIDAD DE LA CLORHEXIDINA SOBRE LA FLORA SALIVAL

4.1.1. Análisis mediante microscopía de epifluorescencia

En el análisis intra-examinador, el coeficiente de correlación intraclass promedio obtenido en las diferentes tomas salivales fue 0,850 ($p < 0,001$) y en el análisis inter-examinador fue 0,890 ($p < 0,001$).

En la Figura 12 se muestran los porcentajes medios de viabilidad bacteriana salival en condiciones basales y a los 30 segundos, 1, 3, 5 y 7 horas después de un único enjuague con agua (UE-agua) y con clorhexidina al 0,2% (UE-CHX 0,2%).

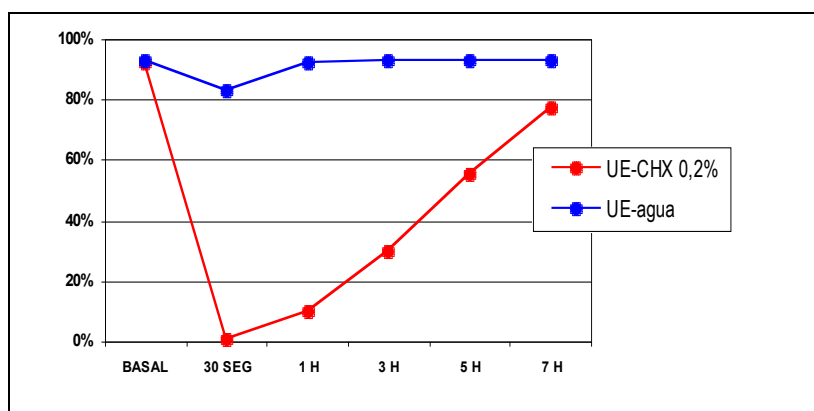


Figura 12. Porcentajes de viabilidad bacteriana en saliva en condiciones basales y a los 30 segundos, 1, 3, 5 y 7 horas después de la aplicación del único enjuague con agua estéril y con colutorio de clorhexidina al 0,2%.

VIABILIDAD BACTERIANA EN SALIVA (%)						
Media ± Desviación Típica (%)						
	BASAL	30 SEG	1 H	3 H	5 H	7 H
UE-agua	92,87 ± 1,80	82,73 ± 2,05	92,27 ± 2,76	92,60 ± 2,09	93,27 ± 1,43	93,13 ± 1,95
UE-CHX 0,2%	92,14 ± 4,24	0,80 ± 1,20	10,33 ± 7,28	29,73 ± 14,85	55,13 ± 19,96	76,87 ± 12,00

UE-agua= Un único enjuague de 30 segundos con 10 mL de agua estéril; UE-CHX 0,2%= Un único enjuague de 30 segundos con 10 mL de CHX al 0,2%; BASAL= Muestra de saliva recogida en condiciones basales; 30 SEG, 1H, 3H, 5H y 7H= Muestra de saliva recogida a los 30 segundos, 1 hora, 3 horas, 5 horas y 7 horas después de la aplicación de los diferentes enjuagues.

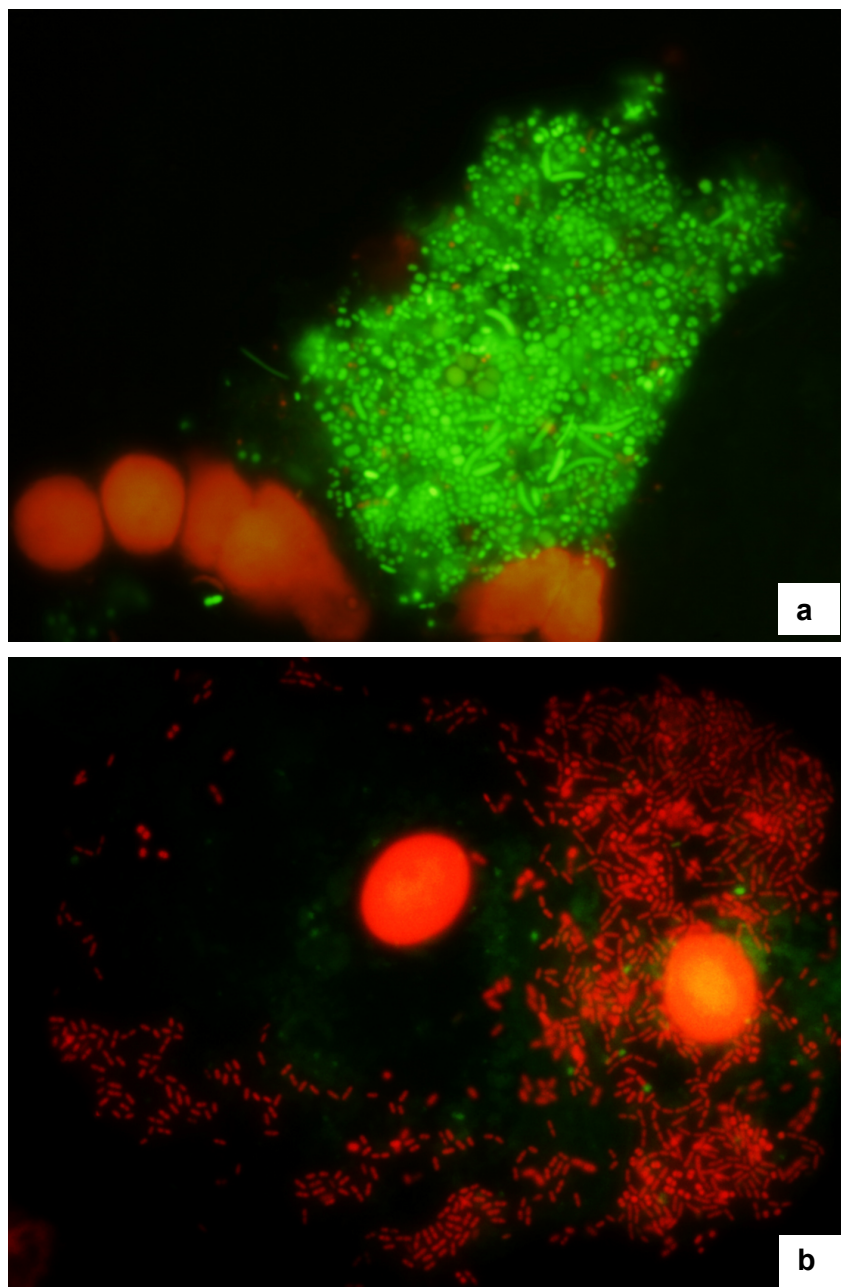


Figura 13. Imágenes representativas de la evolución de la vitalidad bacteriana en saliva: **a)** Muestra basal (recogida antes de un UE-CHX 0,2%), **b)** Muestra recogida a los 30 segundos después de un UE-CHX 0,2%. UE-CHX 0,2%= Un único enjuague de 30 segundos con 10 mL de CHX al 0,2%.

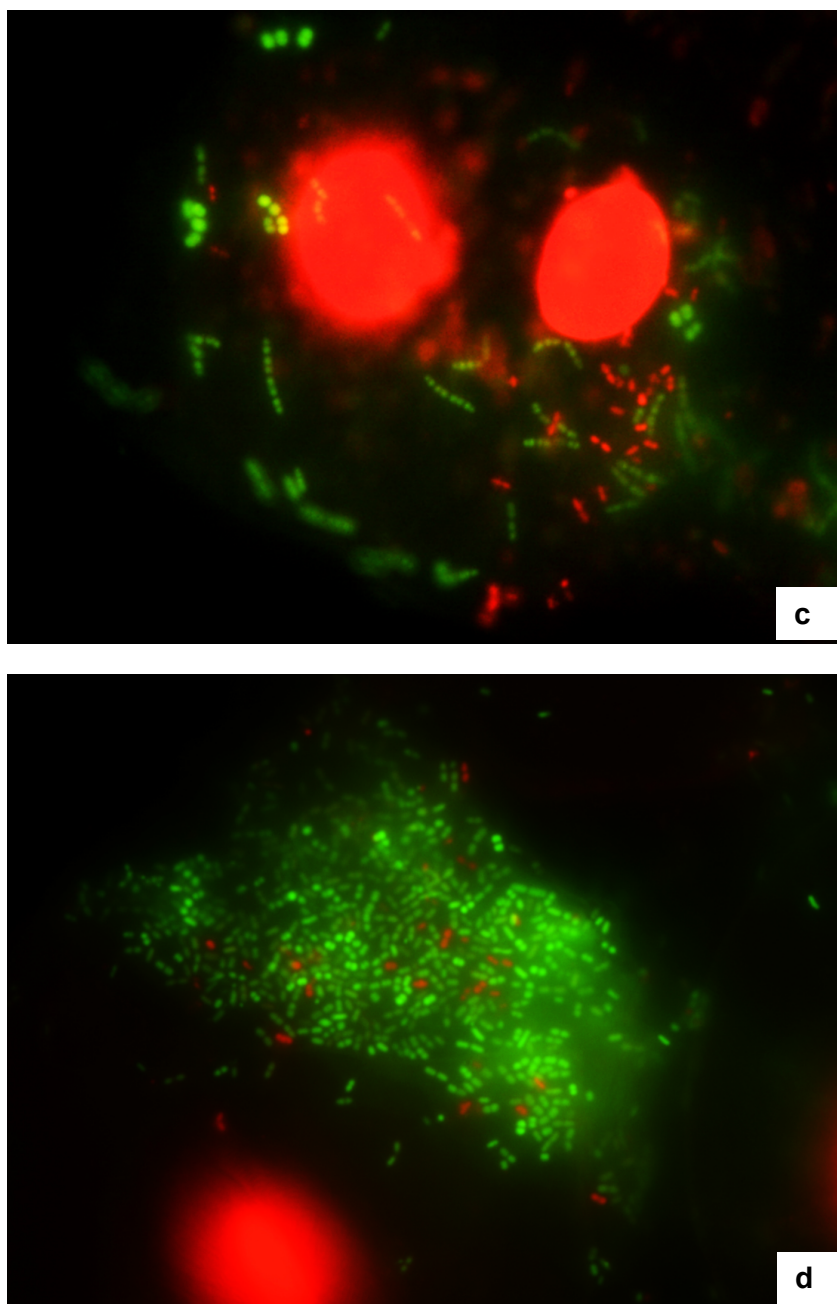


Figura 13 (cont.). Imágenes representativas de la evolución de la vitalidad bacteriana en saliva: **c)** Muestra recogida a las 5 horas después de un UE-CHX 0,2% y **d)** Muestra recogida a las 7 horas después de un UE-CHX 0,2%. UE-CHX 0,2%= Un único enjuague de 30 segundos con 10 mL de CHX al 0,2%.

Resultados

En el análisis intra-enjuague, se detectaron diferencias estadísticamente significativas en la viabilidad bacteriana entre los diferentes tiempos de recogida de las muestras ($p < 0,001$) (Tabla 1). En comparación con los valores basales, la frecuencia de bacterias viables disminuyó significativamente a los 30 segundos después del UE-agua ($RV = 10,13 \pm 0,51\%$, $p < 0,001$) y del UE-CHX 0,2% ($RV = 91,35 \pm 4,37\%$, $p < 0,001$). En comparación con los valores basales, la CHX al 0,2% ejerció una actividad antibacteriana significativa hasta las 7 horas post-enjuague ($RV = 14,14 \pm 11,56\%$, $p < 0,05$). En comparación con los valores obtenidos a los 30 segundos después del UE-CHX 0,2%, se apreció una “recuperación” significativa de la población bacteriana en las tomas salivales posteriores a su aplicación, con un RV que osciló entre $-9,53 \pm 6,24\%$ en las muestras recogidas 1 hora post-enjuague ($p < 0,001$) y $-76,06 \pm 11,72\%$ a las 7 horas post-enjuague ($p < 0,001$) (Tabla 1).

En la muestra pre-enjuague, la frecuencia de bacterias viables fue similar en ambos grupos (UE-agua y UE-CHX 0,2%). En comparación con el UE-agua, las prevalencias de viabilidad fueron significativamente inferiores a los 30 segundos post-enjuague de CHX al 0,2% ($RV = 81,93 \pm 2,46\%$, $p < 0,001$). En comparación con el UE-agua, la CHX al 0,2% ejerció un efecto antibacteriano significativo hasta las 7 horas post-enjuague ($RV = 16,26 \pm 11,72\%$, $p < 0,001$) (Tabla 1).

Tabla 1. Comparaciones intra-enjuague e inter-enjuague de los porcentajes de viabilidad bacteriana en saliva en condiciones basales, a los 30 segundos, 1, 3, 5 y 7 horas después de la aplicación de un único enjuague con agua estéril y con clorhexidina al 0,2%.

VIABILIDAD BACTERIANA EN SALIVA					
ANÁLISIS INTRA-ENJUAGUE					
Diferencia de Medias \pm Desviación Típica (Reducción de la viabilidad, %)					
	BASAL vs 30 SEG	BASAL vs 1 H 30 SEG vs 1 H	BASAL vs 3 H 30 SEG vs 3 H	BASAL vs 5 H 30 SEG vs 5 H	BASAL vs 7 H 30 SEG vs 7 H
UE-agua	10,13 \pm 0,51**	0,60 \pm 1,29 -9,53 \pm 1,18**	0,26 \pm 1,48 -9,86 \pm 1,45**	-0,40 \pm 1,68 -10,53 \pm 1,76**	-0,26 \pm 0,79 -10,40 \pm 0,91**
UE-CHX 0,2%	91,35 \pm 4,37**	81,92 \pm 8,66** -9,53 \pm 6,24**	61,35 \pm 15,09** -28,93 \pm 14,10**	35,50 \pm 18,77** -54,33 \pm 19,21**	14,14 \pm 11,56** -76,06 \pm 11,72**

VIABILIDAD BACTERIANA EN SALIVA					
ANÁLISIS INTER-ENJUAGUE					
Diferencia de Medias \pm Desviación Típica (Reducción de la viabilidad, %)					
Agua vs CHX BASAL	Agua vs CHX 30 SEG	Agua vs CHX 1 H	Agua vs CHX 3 H	Agua vs CHX 5 H	Agua vs CHX 7 H
0,85 \pm 5,49	81,93 \pm 2,46**	81,93 \pm 7,95**	62,86 \pm 15,32**	38,13 \pm 19,80**	16,26 \pm 11,72**

UE-agua= Un único enjuague de 30 segundos con 10 mL de agua estéril; UE-CHX 0,2%= Un único enjuague de 30 segundos con 10 mL de CHX al 0,2%; BASAL= Muestra de saliva recogida en condiciones basales; 30 SEG, 1H, 3H, 5H y 7H= Muestra de saliva recogida a los 30 segundos, 1 hora, 3 horas, 5 horas y 7 horas después de la aplicación de los diferentes enjuagues.

*p< 0,05; ** p< 0,001.

4.1.2. Análisis mediante técnicas microbiológicas

Aplicando técnicas microbiológicas de cultivo en placa, la concentración bacteriana salival fue $8,146 \pm 0,300 \log_{10}$ UFC/mL. Después del UE-CHX 0,2%, las concentraciones bacterianas detectadas en flora salival fueron: a los 30 segundos, $5,481 \pm 0,652 \log_{10}$ UFC/mL; a la hora, $5,508 \pm 0,432 \log_{10}$ UFC/mL; a las 3 horas, $5,779 \pm 0,558 \log_{10}$ UFC/mL; a las 5 horas, $7,001 \pm 0,310 \log_{10}$ UFC/mL; a las 7 horas, $7,042 \pm 0,491 \log_{10}$ UFC/mL.

4.2. EVALUACIÓN DE LA SUSTANTIVIDAD DE LA CLORHEXIDINA SOBRE LA FLORA SALIVAL Y EL BIOFILM DE PLACA DENTAL

Con la técnica de microscopía de epifluorescencia, en el análisis intra-examinador, el coeficiente de correlación intraclase promedio obtenido en las diferentes tomas salivales fue 0,92 ($p < 0,001$), mientras que en el análisis inter-examinador fue 0,87 ($p < 0,001$).

4.2.1. Grosor, viabilidad bacteriana y características estructurales del biofilm de placa dental

Los valores medios del grosor del B-PD en condiciones basales fueron $18,15 \pm 1,17 \mu\text{m}$ antes de efectuar el UE-agua y $22,54 \pm 7,64 \mu\text{m}$ antes de efectuar el UE-CHX 0,2% (rango= 11,75-33,00 μm). Los valores medios de la viabilidad bacteriana del B-PD en condiciones basales fueron $77,44 \pm 7,48\%$ antes de efectuar el UE-agua y $77,89 \pm 9,10\%$ antes de efectuar el UE-CHX 0,2% (rango= 62,04-94,71%).

En relación a las características estructurales del biofilm, se observó un modelo de arquitectura abierta y heterogénea en un 91% de las muestras del B-PD, con predominio en las capas superficial e interna con respecto a la capa intermedia ($p = 0,026$ y $0,026$ respectivamente). La presencia de canales rellenos de fluido se observó en un 29% de las muestras del B-PD, con predominio en las capas intermedias en relación a las capas superficial e interna ($p = 0,023$ y $0,014$ respectivamente). La existencia de estructuras tipo “burbuja” se observó en un 37% de las muestras del B-PD, con predominio en las capas intermedias en relación a las capas superficial e interna ($p = 0,003$ y $0,059$, respectivamente).

4.2.2. Sustantividad de la CHX al 0,2% y su influencia en el grosor del biofilm de placa dental

En comparación con el registro basal, el porcentaje de bacterias vivas aumentó de forma significativa en todas las muestras de B-PD recogidas después de UE-agua (RV a los 30 segundos= $-10,95 \pm 0,32\%$, $p < 0,001$; RV a las 7 horas= $-12,07 \pm 0,41\%$, $p < 0,001$). A los 30 segundos después de UE-CHX 0,2%, el porcentaje de bacterias vivas en el B-PD disminuyó de forma significativa comparado con los valores basales (RV= $72,81 \pm 10,71\%$, $p < 0,001$), detectándose un efecto antimicrobiano significativo hasta 7 horas después del enjuague (RV= $45,98 \pm 19,72\%$, $p < 0,001$). Al comparar el efecto de UE-agua y de UE-CHX 0,2%, la prevalencia de bacterias vivas fue significativamente menor a los 30 segundos después del UE-CHX 0,2% (RV= $83,32 \pm 10,04\%$, $p < 0,001$), detectándose un efecto antimicrobiano significativo hasta 7 horas después del enjuague (RV= $57,60 \pm 23,71\%$; $p < 0,001$) (Tabla 2).

Resultados

Tabla 2. Porcentajes medios de viabilidad bacteriana en el biofilm de placa dental y comparaciones intra-enjuague e inter-enjuague de los porcentajes medios de bacterias viables del biofilm de placa dental en condiciones basales, a los 30 segundos y 1, 3, 5 y 7 horas después de un único enjuague con agua estéril y con clorhexidina al 0,2%.

VIABILIDAD BACTERIANA EN BIOFILM DE PLACA DENTAL (%)						
	BASAL	30 SEG	1 H	3 H	5 H	7 H
UE-agua	77,44 ± 7,48	88,40 ± 7,39	88,54 ± 7,34	92,51 ± 7,42	88,52 ± 7,45	89,52 ± 7,38
UE-CHX 0,2%	77,89 ± 9,10	5,08 ± 5,82	15,61 ± 12,81	35,76 ± 14,41	24,66 ± 16,66	31,91 ± 20,17

VIABILIDAD BACTERIANA EN BIOFILM DE PLACA DENTAL					
ANÁLISIS INTRA-ENJUAGUE					
Diferencia de Medias ± Desviación Típica (Reducción de la viabilidad, %)					
	BASAL vs 30 SEG	BASAL vs 1H 30 SEG vs 1H	BASAL vs 3 H 30 SEG vs 3H	BASAL vs 5H 30SEG vs 5H	BASAL vs 7H 30SEG vs 7H
UE-agua	-10,95 ± 0,32**	-11,10 ± 0,31** -0,14 ± 0,28	-15,06 ± 0,47** -4,11 ± 0,61**	-11,08 ± 0,35** -0,12 ± 0,37	-12,07 ± 0,41** -1,12 ± 0,41**
UE-CHX 0,2%	72,81 ± 10,71**	62,28 ± 13,57** -10,53 ± 15,56	42,13 ± 10,89** -30,68 ± 12,54**	53,23 ± 18,21** -19,58 ± 17,91*	45,98 ± 19,72** -26,83 ± 15,42**

VIABILIDAD BACTERIANA EN BIOFILM DE PLACA DENTAL						
ANÁLISIS INTER-ENJUAGUE						
Diferencia de Medias ± Desviación Típica (Reducción de la viabilidad, %)						
	BASAL	30 SEG	1 H	3 H	5 H	7 H
UE-agua vs UE-CHX 0,2%	-0,45 ± 11,78	83,32 ± 10,04**	72,92 ± 17,66**	56,74 ± 16,29**	63,86 ± 17,38**	57,60 ± 23,71**

UE-agua= Un único enjuague de 30 segundos con 10 mL de agua estéril; UE-CHX 0,2%= Un único enjuague de 30 segundos con 10 mL de CHX al 0,2%;BASAL= Muestra de B-PD recogida en condiciones basales; 30 SEG, 1H, 3H, 5H y 7H= Muestra de B-PD recogida a los 30 segundos, 1 hora, 3 horas, 5 horas y 7 horas después de la aplicación de los diferentes enjuagues.

*p< 0,05; **p< 0,001.

La tabla 3 muestra el porcentaje medio de bacterias viables en el B-PD en condiciones basales y en las muestras recogidas a los 30 segundos y 1, 3, 5 y 7 horas después de la aplicación de UE-agua y de UE-CHX 0,2%, diferenciando entre las tres capas del B-PD, así como las comparaciones de los resultados intra- e inter-enjuague. La prevalencia de bacterias vivas fue significativamente mayor en la capa intermedia con respecto a la interna ($RV = 7,14 \pm 1,06\%$ y $RV = 10,40 \pm 13,37\%$, respectivamente; $p < 0,001$ y $p = 0,028$, respectivamente). La prevalencia de bacterias vivas fue significativamente menor en las tres capas del B-PD en todas las muestras recogidas después del UE-CHX 0,2%, que tras el UE-agua ($p < 0,001$ en todas las comparaciones) (Tabla 3).

Resultados

Tabla 3. Porcentajes medios de bacterias viables del biofilm de placa dental en condiciones basales y en las muestras recogidas a los 30 segundos, 1, 3, 5, y 7 horas después de un único enjuague con agua estéril y con clorhexidina al 0,2%, diferenciando entre las tres capas del biofilm, así como las comparaciones intra-enjuague e inter-enjuague.

VIABILIDAD BACTERIANA EN BIOFILM DE PLACA DENTAL						
Media \pm Desviación Típica (%)						
	BASAL	30 SEG	1 H	3 H	5 H	7 H
UE-agua						
Capa 3	85,58 \pm 8,36	93,56 \pm 8,37	95,63 \pm 8,28	94,74 \pm 8,25	97,53 \pm 8,30	95,69 \pm 8,34
Capa 2	76,73 \pm 7,41	87,48 \pm 7,33	90,59 \pm 7,42	93,58 \pm 7,52	92,72 \pm 7,29	91,52 \pm 7,36
Capa 1	69,58 \pm 8,26	84,55 \pm 8,34	79,73 \pm 8,28	91,60 \pm 8,29	76,57 \pm 8,35	77,69 \pm 8,39
UE-CHX 0,2%						
Capa 3	79,94 \pm 6,21	5,20 \pm 6,19	15,13 \pm 15,43	35,42 \pm 15,53	21,70 \pm 19,74	27,04 \pm 22,64
Capa 2	82,21 \pm 7,83	5,05 \pm 6,43	16,54 \pm 15,61	36,70 \pm 16,42	24,83 \pm 20,62	28,65 \pm 20,76
Capa 1	71,80 \pm 17,43	4,97 \pm 5,04	15,16 \pm 10,21	35,16 \pm 14,83	27,44 \pm 13,45	40,04 \pm 20,37

ANÁLISIS INTRA-ENJUAGUE						
Diferencia de Medias \pm Desviación Típica (Reducción de la viabilidad, %)						
	BASAL	30 SEG	1 H	3 H	5 H	7 H
UE-agua						
Capa 3 vs Capa 2	8,84 \pm 1,06**	6,08 \pm 9,12	5,04 \pm 0,91**	1,15 \pm 0,83**	4,80 \pm 1,09**	4,17 \pm 1,14**
Capa 3 vs Capa 1	15,99 \pm 0,44**	9,01 \pm 0,40**	15,90 \pm 0,23**	3,14 \pm 0,56**	20,96 \pm 0,32**	18,00 \pm 0,47**
Capa 2 vs Capa 1	7,14 \pm 1,06**	2,93 \pm 9,08	10,86 \pm 0,91**	1,98 \pm 1,00**	16,15 \pm 1,09**	13,83 \pm 1,13**
UE-CHX 0,2%						
Capa 3 vs Capa 2	-2,26 \pm 1,57	0,15 \pm 1,37	-1,40 \pm 3,50	-1,28 \pm 6,94	-3,12 \pm 4,99	-1,61 \pm 7,57
Capa 3 vs Capa 1	8,14 \pm 15,64	0,23 \pm 1,78	-0,02 \pm 12,07	0,25 \pm 11,93	-5,73 \pm 13,76	-12,99 \pm 14,42*
Capa 2 vs Capa 1	10,40 \pm 13,37*	0,08 \pm 2,35	1,37 \pm 11,14	1,54 \pm 11,50	-2,61 \pm 16,59	-11,38 \pm 12,16*

ANÁLISIS INTER-ENJUAGUE						
Diferencia de Medias \pm Desviación Típica (Reducción de la viabilidad, %)						
	BASAL	30 SEG	1 H	3 H	5 H	7 H
UE-agua vs UE CHX 0,2%						
Capa 3 vs Capa 3	5,63 \pm 8,86	88,35 \pm 10,87**	80,50 \pm 20,10**	59,32 \pm 15,77**	75,82 \pm 20,37**	68,65 \pm 26,73**
Capa 2 vs Capa 2	-5,47 \pm 12,02	82,43 \pm 6,92**	74,05 \pm 20,23**	56,88 \pm 17,76**	67,89 \pm 20,42**	62,87 \pm 25,40**
Capa 1 vs Capa 1	-2,21 \pm 19,45	79,57 \pm 9,93**	64,56 \pm 16,46**	56,44 \pm 18,40**	49,12 \pm 16,79**	37,65 \pm 22,87*

UE-agua= Un único enjuague de 30 segundos con 10 mL de agua estéril; UE-CHX 0,2%= Un único enjuague de 30 segundos con 10 mL de CHX al 0,2%; BASAL= Muestra de B-PD recogida en condiciones basales; 30 SEG, 1H, 3H, 5H y 7H= Muestra de B-PD recogida a los 30 segundos, 1 hora, 3 horas, 5 horas y 7 horas después de la aplicación de los diferentes enjuagues; Capa 1: capa interna, capa 2: capa intermedia y capa 3: capa externa.

*p< 0,05; **p< 0,001.

La tabla 4 muestra los valores medios del grosor (μm) del B-PD en condiciones basales y a los 30 segundos y 1, 3, 5 y 7 horas después de UE-agua y UE-CHX 0,2%, así como las comparaciones de los resultados intra- e inter-enjuague. El grosor del B-PD aumentó significativamente a las 5 y 7 horas después del UE-agua, en comparación con los valores basales y con los obtenidos 30 segundos después de enjuagarse (RG a las 5 horas= $-11,22 \pm 1,45 \mu\text{m}$ y $-12,41 \pm 1,48 \mu\text{m}$ y RG a las 7 horas= $-9,53 \pm 1,66 \mu\text{m}$ y $-10,72 \pm 1,50 \mu\text{m}$; $p < 0,001$ y $p < 0,001$ respectivamente). En comparación con los valores basales, UE-CHX 0,2% provocó un efecto de reducción del grosor del B-PD a la hora, a las 3 y a las 7 horas después de su aplicación, en comparación con los valores basales (RG= $9,07 \mu\text{m} \pm 8,24 \mu\text{m}$; $7,19 \pm 7,63 \mu\text{m}$ y $6,99 \pm 7,41 \mu\text{m}$, respectivamente; $p < 0,05$). El grosor del B-PD resultó significativamente menor en todas las muestras recogidas después de 1 hora del UE-CHX 0,2% en comparación con el obtenido tras UE-agua, excepto en la muestra obtenida a las 3 horas (RG a la hora= $5,23 \pm 2,34 \mu\text{m}$; RG a las 5 horas= $11,86 \pm 3,76$; RG a las 7 horas= $12,13 \pm 1,99 \mu\text{m}$; $p < 0,001$).

Resultados

Tabla 4. Valores medios de grosor (μm) del biofilm de placa dental en condiciones basales y en las muestras recogidas a los 30 segundos, 1, 3, 5 y 7 horas después de un único enjuague con agua estéril y con clorhexidina al 0,2%, diferenciando entre las 3 capas del biofilm, así como las comparaciones intra-enjuague e inter-enjuague.

GROSOR DEL BIOFILM DE PLACA DENTAL						
Media \pm Desviación Típica (μm)						
	BASAL	30 SEG	1 H	3 H	5 H	7 H
UE-agua	18,15 \pm 1,17	16,96 \pm 1,10	18,70 \pm 1,01	14,55 \pm 0,80	29,37 \pm 0,99	27,68 \pm 1,14
UE-CHX 0,2%	22,54 \pm 7,64	15,76 \pm 1,87	13,46 \pm 2,54	15,35 \pm 2,92	17,51 \pm 3,88	15,55 \pm 2,31

ANÁLISIS INTRA-ENJUAGUE					
Diferencia de Medias \pm Desviación Típica (Reducción del grosor, μm)					
	BASAL vs 30 SEG	BASAL vs 1H 30 SEG vs 1H	BASAL vs 3 H 30 SEG vs 3H	BASAL vs 5H 30 SEG vs 5H	BASAL vs 7H 30 SEG vs 7H
UE-agua	1,19 \pm 1,64	-0,54 \pm 1,52 -1,74 \pm 1,56*	3,59 \pm 1,52** 2,40 \pm 1,72**	-11,22 \pm 1,45** -12,41 \pm 1,48**	-9,53 \pm 1,66** -10,72 \pm 1,50**
UE-CHX 0,2%	6,77 \pm 7,94	9,07 \pm 8,24* 2,30 \pm 2,54	7,19 \pm 7,63* 0,41 \pm 2,88	5,02 \pm 6,99 -1,75 \pm 4,55	6,99 \pm 7,41* 0,21 \pm 2,71

ANÁLISIS INTER-ENJUAGUE						
Diferencia de Medias \pm Desviación Típica (Reducción del grosor, μm)						
	BASAL	30 SEG	1 H	3 H	5 H	7 H
UE-agua vs UE CHX 0,2%	-4,38 \pm 8,30	1,19 \pm 2,44 [†]	5,23 \pm 2,34**	-0,79 \pm 3,28	11,86 \pm 3,76**	12,13 \pm 1,99**

UE-agua= Un único enjuague de 30 segundos con 10 mL de agua estéril; UE-CHX 0,2%= Un único enjuague de 30 segundos con 10 mL de CHX al 0,2%; BASAL= Muestra de B-PD recogida en condiciones basales; 30 SEG, 1H, 3H, 5H y 7H= Muestra de B-PD recogida a los 30 segundos, 1 hora, 3 horas, 5 horas y 7 horas después de la aplicación de los diferentes enjuagues.

*p< 0,05; **p< 0,001; [†]p= 0,069.

4.2.3. Sustantividad de la CHX al 0,2% en saliva *versus* biofilm de placa dental

La Figura 14 muestra los porcentajes medios de viabilidad bacteriana en saliva y B-PD en condiciones basales, a los 30 segundos y 1, 3, 5 y 7 horas después de UE-agua y UE-CHX 0,2%.

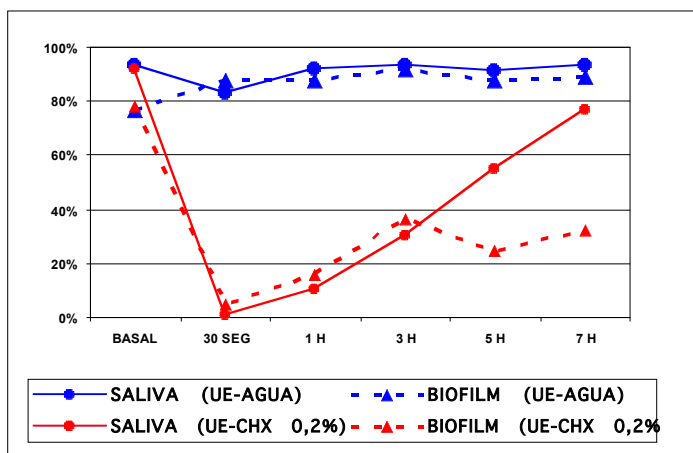


Figura 14. Porcentajes medios de viabilidad bacteriana en el biofilm de placa dental *de novo* y saliva en condiciones basales, a los 30 segundos y 1, 3, 5 y 7 horas después de un único enjuague con agua estéril y con clorhexidina al 0,2%.

VIABILIDAD BACTERIANA EN SALIVA (%)						
	BASAL	30 SEG	1 H	3 H	5 H	7 H
UE-agua	92,86 ± 1,80	82,73 ± 2,05	92,26 ± 2,76	92,60 ± 2,09	91,13 ± 1,76	93,13 ± 1,95
UE-CHX 0,2%	92,26 ± 4,11	0,80 ± 1,20	10,33 ± 7,28	29,73 ± 14,85	55,13 ± 19,96	76,86 ± 12,00

VIABILIDAD BACTERIANA EN BIOFILM DE PLACA DENTAL (%)						
	BASAL	30 SEG	1 H	3 H	5 H	7 H
UE-agua	77,44 ± 7,48	88,40 ± 7,39	88,54 ± 7,34	92,51 ± 7,42	88,52 ± 7,45	89,52 ± 7,38
UE-CHX 0,2%	77,89 ± 9,10	5,08 ± 5,82	15,61 ± 12,81	35,76 ± 14,41	24,66 ± 16,66	31,91 ± 20,17

UE-agua= Un único enjuague de 30 segundos con 10 mL de agua estéril; UE-CHX 0,2%= Un único enjuague de 30 segundos con 10 mL de CHX al 0,2%; BASAL= Muestras de saliva y de B-PD recogidas en condiciones basales; 30 SEG, 1H, 3H, 5H y 7H= Muestras de saliva y de B-PD recogidas a los 30 segundos, 1 hora, 3 horas, 5 horas y 7 horas después de la aplicación de los diferentes enjuagues; B-PD= Biofilm de placa dental.

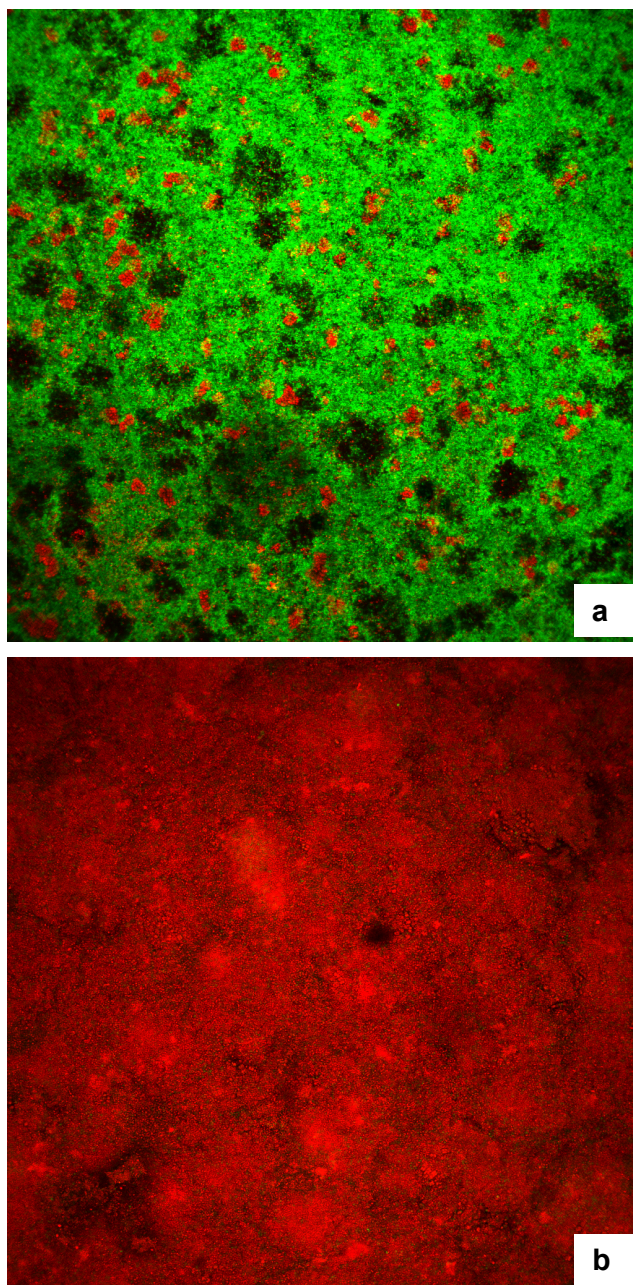


Figura 15. Imágenes representativas de la evolución de la vitalidad bacteriana en el biofilm de placa dental: **a)** Muestra basal (recogida antes de un UE-CHX 0,2%), **b)** Muestra recogida a los 30 segundos después de un UE-CHX 0,2%. UE-CHX 0,2%= Un único enjuague de 30 segundos con 10 mL de CHX al 0,2%.

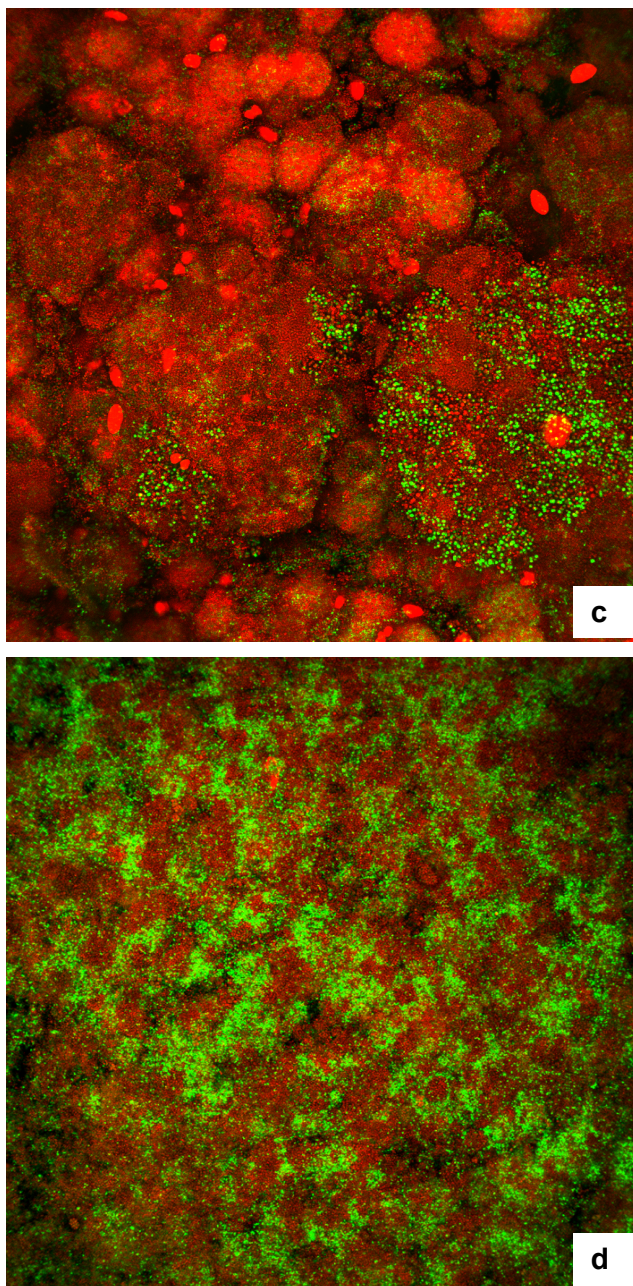


Figura 15 (cont.). Imágenes representativas de la evolución de la vitalidad bacteriana en el biofilm de placa dental: **c)** Muestra recogida a las 3 horas después de un UE-CHX 0,2% y **d)** Muestra recogida a las 7 horas después de un UE-CHX 0,2. UE-CHX 0,2%= Un único enjuague de 30 segundos con 10 mL de CHX al 0,2%.

Resultados

La viabilidad bacteriana media en la saliva en condiciones basales fue significativamente mayor que la detectada en el B-PD (RV= $-15,42 \pm 7,17\%$, $p < 0,001$ para UE-agua; RV= $-14,36 \pm 9,79\%$, $p < 0,001$ para UE-CHX 0,2%). A los 30 segundos después de UE-CHX 0,2%, los niveles detectados de bacterias viables en saliva fueron significativamente menores que aquéllos observados en B-PD (RV= $4,28 \pm 5,63\%$; $p = 0,011$). A la hora y a las 3 horas después de UE-CHX 0,2%, los niveles de bacterias viables detectados en saliva y en B-PD resultaron similares. Los porcentajes de bacterias vivas en saliva fueron significativamente mayores a los observados en el B-PD a las 5 horas (RV= $-30,47 \pm 27,68\%$; $p = 0,001$) y a las 7 horas después de UE-CHX 0,2% (RV= $-44,95 \pm 25,02\%$; $p < 0,001$) (Tabla 5).

Tabla 5. Comparaciones inter-ecosistema de los porcentajes medios de bacterias viables en saliva y en el biofilm de placa dental en condiciones basales y en las muestras recogidas a los 30 segundos y 1, 3, 5 y 7 horas después de un único enjuague con agua estéril y con clorhexidina al 0,2%.

VIABILIDAD BACTERIANA-ANÁLISIS INTERECOSISTEMA						
Diferencia de Medias \pm Desviación Típica (Reducción de la viabilidad, %)						
	BASAL	30 SEG	1 H	3 H	5 H	7 H
UE-agua B-PD vs saliva	$-15,42 \pm 7,17^{**}$	$5,66 \pm 7,13^*$	$-3,72 \pm 7,34$	$-0,08 \pm 7,63$	$-2,60 \pm 7,72$	$-3,61 \pm 7,12$
UE-CHX 0,2% B-PD vs saliva	$-14,36 \pm 9,79^{**}$	$4,28 \pm 5,63^*$	$5,28 \pm 16,52$	$6,03 \pm 18,59$	$-30,47 \pm 27,68^*$	$-44,95 \pm 25,02^{**}$

UE-agua= Un único enjuague de 30 segundos con 10 mL de agua estéril; UE-CHX 0,2%= Un único enjuague de 30 segundos con 10 mL de CHX al 0,2%; BASAL= Muestras de saliva y de B-PD recogidas en condiciones basales; 30 SEG, 1H, 3H, 5H y 7H= Muestras de saliva y de B-PD recogidas a los 30 segundos, 1 hora, 3 horas, 5 horas y 7 horas después de la aplicación de los diferentes enjuagues.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$.

4.3. INFLUENCIA DEL RITMO CIRCADIANO EN LA SUSTANTIVIDAD *IN VIVO* DE LA CLORHEXIDINA

Con la técnica de microscopía de epifluorescencia, en el análisis intra-examinador, el coeficiente de correlación intraclase promedio obtenido en las diferentes tomas salivales fue 0,92 ($p < 0,001$), mientras que en el análisis inter-examinador fue 0,91 ($p < 0,001$).

4.3.1. Influencia sobre el grosor del biofilm de placa dental

En la tabla 6 se muestran los valores medios de grosor (μm) del B-PD detectados a las 8, 10 y 12 horas después de efectuar una única aplicación de CHX al 0,2%, así como las comparaciones intra- e inter-enjuague. El grosor medio del B-PD osciló entre $15,26 \pm 2,82 \mu\text{m}$ y $18,40 \pm 5,10 \mu\text{m}$. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas en el grosor del B-PD en el análisis intra-enjuague (entre los diferentes tiempos de recogida de las muestras) ni en el análisis inter-enjuague (entre el ENJ-CHX-diurno y el ENJ-CHX-nocturno).

Resultados

Tabla 6. Valores medios de grosor del biofilm de placa dental (μm) detectados a las 8, 10 y 12 horas después de efectuar una única aplicación de clorhexidina al 0,2%, diferenciando entre el enjuague de clorhexidina diurno y el enjuague de clorhexidina nocturno, así como las comparaciones intra- e inter-enjuague.

GROSOR DEL BIOFILM DE PLACA DENTAL		
Media \pm Desviación Típica (μm)		
	ENJ-CHX-diurno	ENJ-CHX-nocturno
8 horas post-aplicación	17,22 \pm 3,58	15,48 \pm 4,16
10 horas post-aplicación	18,40 \pm 5,10	15,91 \pm 1,55
12 horas post-aplicación	15,51 \pm 3,54	15,26 \pm 2,82

ANÁLISIS INTRA-ENJUAGUE		
Diferencia de Medias \pm Desviación Típica (Reducción del grosor, μm ; p)		
ENJ-CHX-diurno: 8 horas vs 10 horas	-1,17 \pm 4,13	1,000
ENJ-CHX-diurno: 8 horas vs 12 horas	1,71 \pm 3,88	0,670
ENJ-CHX-diurno: 10 horas vs 12 horas	2,88 \pm 3,02	0,063
ENJ-CHX-nocturno: 8 horas vs 10 horas	-0,43 \pm 3,54	1,000
ENJ-CHX-nocturno: 8 horas vs 12 horas	0,22 \pm 3,77	1,000
ENJ-CHX-nocturno: 10 horas vs 12 horas	0,65 \pm 3,28	1,000

ANÁLISIS INTER-ENJUAGUE		
Diferencia de Medias \pm Desviación Típica (Reducción del grosor, μm ; p)		
8 horas: ENJ-CHX-diurno vs ENJ-CHX-nocturno	1,73 \pm 5,29	0,354
10 horas: ENJ-CHX-diurno vs ENJ-CHX-nocturno	2,48 \pm 5,87	0,240
12 horas: ENJ-CHX-diurno vs ENJ-CHX-nocturno	0,25 \pm 3,19	0,820

ENJ-CHX-diurno= Un único enjuague de 10 mL durante 30 segundos con CHX al 0,2% efectuado a las 7 a.m.; ENJ-CHX-nocturno= Un único enjuague de 10 mL durante 30 segundos con CHX al 0,2% efectuado a la 1 a.m.

4.3.2. Influencia sobre la flora salival y el biofilm de placa dental

En la tabla 7 se muestran los porcentajes de viabilidad bacteriana en la flora salival y en el B-PD detectados a las 8, 10 y 12 horas después de efectuar una única aplicación de CHX al 0,2%, diferenciando entre el ENJ-CHX-diurno y el ENJ-CHX-nocturno. En saliva, los porcentajes de viabilidad bacteriana oscilaron entre $22,22 \pm 7,94\%$ y $82,88 \pm 6,48\%$, mientras que en el B-PD oscilaron entre $35,32 \pm 10,93\%$ y $39,76 \pm 13,32\%$.

Tabla 7. Porcentajes medios de viabilidad bacteriana en la flora salival y en el biofilm de placa dental detectados a las 8, 10 y 12 horas después de efectuar una única aplicación de clorhexidina al 0,2%, diferenciando entre el enjuague de clorhexidina diurno y el enjuague de clorhexidina nocturno.

VIABILIDAD BACTERIANA EN SALIVA		
Media \pm Desviación Típica (%)		
	ENJ-CHX-diurno	ENJ-CHX-nocturno
8 horas post-aplicación	59,66 \pm 8,73	22,22 \pm 7,94
10 horas post-aplicación	71,44 \pm 8,77	40,66 \pm 9,00
12 horas post-aplicación	82,88 \pm 6,48	57,22 \pm 8,77

VIABILIDAD BACTERIANA EN BIOFILM DE PLACA DENTAL		
Media \pm Desviación Típica (%)		
	ENJ-CHX-diurno	ENJ-CHX-nocturno
8 horas post-aplicación	39,76 \pm 13,32	36,46 \pm 12,03
10 horas post-aplicación	35,85 \pm 10,80	35,78 \pm 10,56
12 horas post-aplicación	36,95 \pm 12,85	35,32 \pm 10,93

ENJ-CHX-diurno= Un único enjuague de 10 mL durante 30 segundos con CHX al 0,2% efectuado a las 7 a.m.; ENJ-CHX-nocturno= Un único enjuague de 10 mL durante 30 segundos con CHX al 0,2% efectuado a la 1 a.m.

En la flora salival, se detectaron diferencias estadísticamente significativas en la viabilidad bacteriana en el análisis intra-enjuague (entre los diferentes tiempos de recogida de las muestras) y el análisis inter-enjuague (entre el ENJ-CHX-diurno y el ENJ-CHX-nocturno) (Tabla 8). En las comparaciones por pares intra-enjuague, el porcentaje de bacterias viables aumentó con el

Resultados

transcurso del tiempo (8 horas vs 10 horas vs 12 horas), tanto en el ENJ-CHX-diurno (las RV oscilaron entre $-11,44 \pm 8,20\%$ y $-23,22 \pm 5,71\%$) como en el ENJ-CHX-nocturno (las RV oscilaron entre $-16,55 \pm 6,54\%$ y $-35,00 \pm 9,77\%$), alcanzándose la significación estadística en todos los contrastes ($p= 0,000-0,026$).

Tabla 8. Comparaciones intra- e inter-enjuague de los porcentajes medios de viabilidad bacteriana en la flora salival y en el biofilm de placa dental detectados a las 8, 10 y 12 horas después de efectuar una única aplicación de clorhexidina al 0,2%, diferenciando entre el enjuague de clorhexidina diurno y el enjuague de clorhexidina nocturno.

VIABILIDAD BACTERIANA EN SALIVA		
Diferencia de Medias \pm Desviación Típica (Reducción de la viabilidad, %; p)		
COMPARACIONES INTRA-ENJUAGUE CHX		
ENJ-CHX-diurno: 8 horas vs 10 horas	$-11,77 \pm 10,25$	0,026
ENJ-CHX-diurno: 8 horas vs 12 horas	$-23,22 \pm 5,71$	<0,001
ENJ-CHX-diurno: 10 horas vs 12 horas	$-11,44 \pm 8,20$	0,009
ENJ-CHX-nocturno: 8 horas vs 10 horas	$-18,44 \pm 8,26$	<0,001
ENJ-CHX-nocturno: 8 horas vs 12 horas	$-35,00 \pm 9,77$	<0,001
ENJ-CHX-nocturno: 10 horas vs 12 horas	$-16,55 \pm 6,54$	<0,001
COMPARACIONES INTER-ENJUAGUE CHX		
8 horas: ENJ-CHX-diurno vs ENJ-CHX-nocturno	$37,44 \pm 7,24$	<0,001
10 horas: ENJ-CHX-diurno vs ENJ-CHX-nocturno	$30,77 \pm 11,91$	<0,001
12 horas: ENJ-CHX-diurno vs ENJ-CHX-nocturno	$25,66 \pm 9,56$	<0,001

VIABILIDAD BACTERIANA EN BIOFILM DE PLACA DENTAL		
Diferencia de Medias \pm Desviación Típica (Reducción de la viabilidad, %; p)		
COMPARACIONES INTRA-ENJUAGUE CHX		
ENJ-CHX-diurno: 8 horas vs 10 horas	$3,90 \pm 12,63$	1,000
ENJ-CHX-diurno: 8 horas vs 12 horas	$2,80 \pm 13,47$	1,000
ENJ-CHX-diurno 10 horas vs 12 horas	$-1,09 \pm 12,91$	1,000
ENJ-CHX-nocturno: 8 horas vs 10 horas	$0,67 \pm 10,24$	1,000
ENJ-CHX-nocturno: 8 horas vs 12 horas	$1,14 \pm 9,15$	1,000
ENJ-CHX-nocturno: 10 horas vs 12 horas	$0,46 \pm 11,36$	1,000
COMPARACIONES INTER-ENJUAGUE CHX		
8 horas: ENJ-CHX-diurno vs ENJ-CHX-nocturno	$3,29 \pm 9,91$	0,348
10 horas: ENJ-CHX-diurno vs ENJ-CHX-nocturno	$0,07 \pm 16,44$	0,990
12 horas: ENJ-CHX-diurno vs ENJ-CHX-nocturno	$1,63 \pm 12,01$	0,694

ENJ-CHX-diurno= Un único enjuague de 10 mL durante 30 segundos con CHX al 0,2% efectuado a las 7 a.m.; ENJ-CHX-nocturno= Un único enjuague de 10 mL durante 30 segundos con CHX al 0,2% efectuado a la 1 a.m.

En las comparaciones por pares inter-enjuague, los porcentajes de bacterias viables obtenidos con el ENJ-CHX-diurno en flora salival fueron significativamente superiores a los detectados con el ENJ-CHX-nocturno (las RV oscilaron entre $25,66 \pm 9,56\%$ y $37,44 \pm 7,24\%$; $p < 0,001$).

En el B-PD no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en la viabilidad bacteriana en el análisis intra-enjuague (entre los diferentes tiempos de recogida de las muestras) ni en el análisis inter-enjuague (entre el ENJ-CHX-diurno y el ENJ-CHX-nocturno) (Tabla 8).

En las figuras 16 y 18 se contrastan las prevalencias de viabilidad bacteriana en la flora salival y en el B-PD detectadas a las 8, 10 y 12 horas después de efectuar un ENJ-CHX-diurno y un ENJ-CHX-nocturno. En el ENJ-CHX-diurno, la frecuencia de bacterias viables presente en la flora salival fue significativamente superior a la observada en el B-PD a las 8 horas ($59,66$ vs $39,76\%$; $p < 0,001$), 10 horas ($71,44$ vs $35,85\%$; $p < 0,001$) y 12 horas post-enjuague ($82,88$ vs $36,95\%$; $p < 0,001$). En el ENJ-CHX-nocturno, el porcentaje de bacterias viables presente en la flora salival fue significativamente inferior a la observada en el B-PD a las 8 horas ($22,22$ vs $36,46\%$; $p = 0,014$) y superior a las 12 horas post-enjuague ($57,22$ vs $35,32\%$; $p < 0,001$).

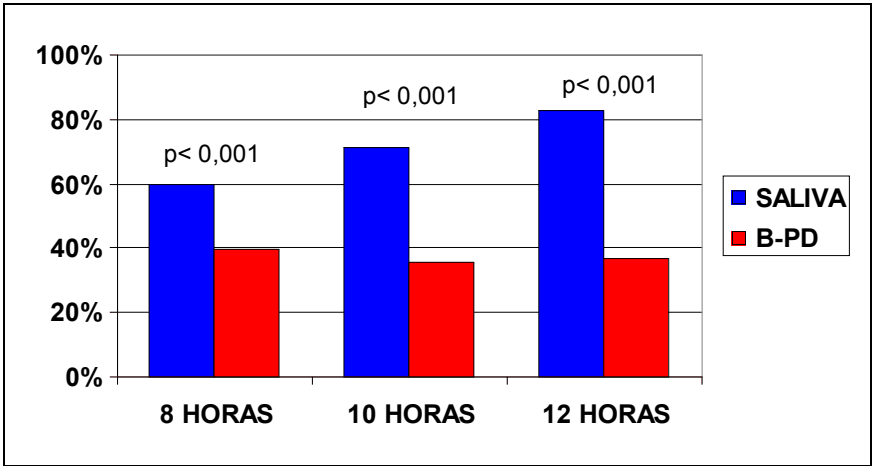


Figura 16. Porcentajes de viabilidad bacteriana en la flora salival y en el biofilm de placa dental detectados a las 8, 10 y 12 horas después de efectuar un enjuague diurno con CHX al 0,2%. ENJ-CHX-diurno= Un único enjuague de 10 mL durante 30 segundos con CHX al 0,2% efectuado a las 7 a.m.

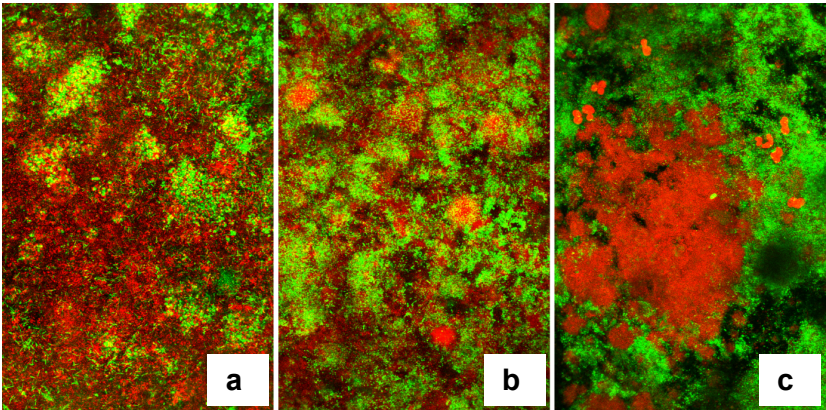


Figura 17. Imágenes representativas de la evolución de la vitalidad bacteriana en el biofilm de placa dental: **a)** Muestra recogida a las 8 horas después de un ENJ-CHX-diurno, **b)** Muestra recogida a las 10 horas después de un ENJ-CHX-diurno y **c)** Muestra recogida a las 12 horas después de un ENJ-CHX-diurno. ENJ-CHX-diurno= Un único enjuague de 10 mL durante 30 segundos con CHX al 0,2% efectuado a las 7 a.m.

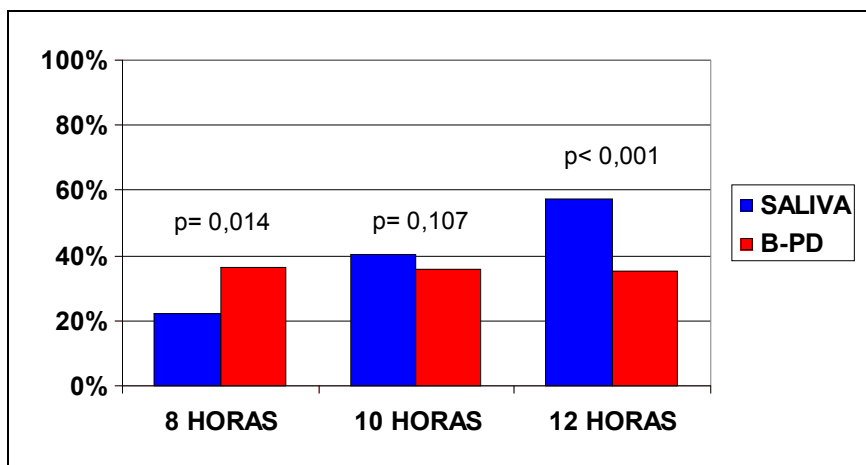


Figura 18. Porcentajes de viabilidad bacteriana en la flora salival y en el biofilm de placa dental detectados a las 8, 10 y 12 horas después de efectuar un enjuague nocturno con CHX al 0,2%. ENJ-CHX-nocturno= Un único enjuague de 10 mL durante 30 segundos con CHX al 0,2% efectuado a la 1 a.m.

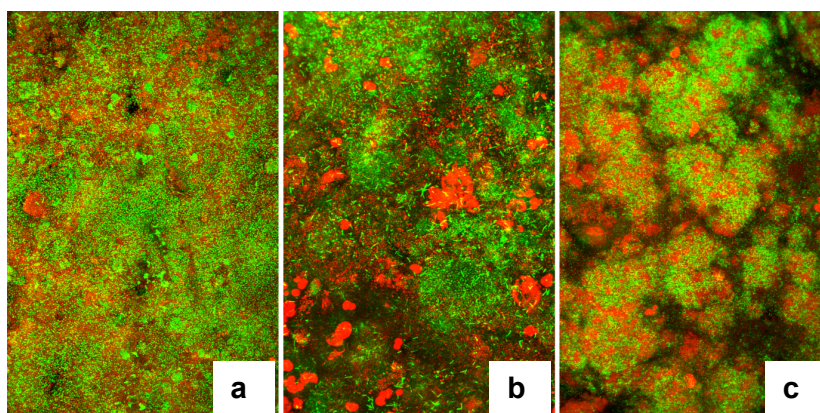


Figura 19. Imágenes representativas de la evolución de la vitalidad bacteriana en el biofilm de placa dental: **a)** Muestra recogida a las 8 horas después de un ENJ-CHX-nocturno, **b)** Muestra recogida a las 10 horas después de un ENJ-CHX-nocturno y **c)** Muestra recogida a las 12 horas después de un ENJ-CHX-nocturno. ENJ-CHX-nocturno= Un único enjuague de 10 mL durante 30 segundos con CHX al 0,2% efectuado a la 1 a.m.

5. DISCUSIÓN

5.1. EVALUACIÓN DE LA SUSTANTIVIDAD DE LA CLORHEXIDINA SOBRE LA FLORA SALIVAL APLICANDO MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA

La determinación de los recuentos bacterianos mediante cultivos en placa es la metodología empleada en la mayoría de los trabajos publicados sobre sustentividad *in vivo* de la CHX sobre la flora salival (Moran *et al*, 1992; Jenkins *et al*, 1994; Elworthy *et al*, 1996; Balbuena *et al*, 1998). Sin embargo, hay autores que han cuestionado la fiabilidad de esta técnica, a la que atribuyen numerosos inconvenientes como: representar un análisis retrospectivo de la vitalidad bacteriana (Berney *et al*, 2007); el conteo se basa en la determinación del número de UFC/mL y no del número de bacterias individuales (Weiger *et al*, 1998); la dificultad en garantizar los requerimientos fisiológicos y metabólicos de una comunidad polimicrobiana (como es la flora salival) para su reproducción *in vitro* (Nadkarni *et al*, 2002; Biggerstaff *et al*, 2006); y la existencia de factores como los medios de transporte y de cultivo, la temperatura, la atmósfera y el período de incubación, que condicionan su reproducibilidad (Boulos *et al*, 1999; Lehtinen *et al*, 2004). Estos inconvenientes podrían favorecer la infraestimación de la vitalidad bacteriana (Boulos *et al*, 1999) o incluso la sobreestimación de algunos géneros bacterianos. Por otra parte, la heterogeneidad de las metodologías aplicadas (el uso de agentes neutralizantes de la CHX en los medios de transporte y/o cultivo, el número de diluciones seriadas, el tipo de población bacteriana cultivada y la aplicación de diferentes criterios para la interpretación de los hallazgos) (Addy *et al*, 1991; Jenkins *et al*, 1994; Buckner *et al*, 1994; Pitten y Kramer, 1999; Sreenivasan y Gittins, 2004b) dificulta la comparación de los resultados entre las diferentes series.

En consecuencia, algunos autores propusieron como metodología alternativa para la cuantificación de poblaciones bacterianas viables, el empleo de la microscopía de epifluorescencia con fluorocromos específicos, como la solución LIVE/DEAD® BacLight™ (Boulos *et al*,

1999; Nadkarni *et al*, 2002). Entre las ventajas más destacables de este sistema se incluyen: es una técnica rápida y de fácil uso, que cuantifica la viabilidad bacteriana en “tiempo real” (Boulos *et al*, 1999); la solución SYTO 9/YP permite la determinación simultánea de bacterias viables y no-viables (Boulos *et al*, 1999); y la posibilidad de detectar bacterias no-cultivables con técnicas de cultivo en placa (Joux y Lebaron, 2000; Berney *et al*, 2007).

Algunos autores estudiaron la correlación de ambas técnicas (cultivo en placa *versus* microscopía de epifluorescencia con la solución SYTO 9/YP) para la cuantificación bacteriana en muestras de agua potable, obteniendo resultados heterogéneos (Boulos *et al*, 1999; Lahtinen *et al*, 2006). En nuestra opinión, el efecto antibacteriano inmediato observado con ambas técnicas microbiológicas podría ser interpretado de forma similar. Sin embargo, y de acuerdo con trabajos previos (Boulos *et al*, 1999; Ihalin *et al*, 2003), observamos que la técnica del cultivo en placa podría sobreestimar la sustentividad *in vivo* de la CHX, ya que detectamos un incremento significativo y progresivo de la viabilidad bacteriana en las diferentes muestras salivales post-enjuague aplicando la técnica de la microscopía de epifluorescencia con la solución SYTO 9/YP.

La ausencia de correlación entre ambas técnicas microbiológicas (cultivo en placa *versus* microscopía de epifluorescencia con la solución SYTO 9/YP) probablemente se debe a las diferentes características descritas para cada técnica. Por otra parte, algunos autores sugirieron que: "la membrana celular tiene una función vital en la supervivencia bacteriana, pero esto no implica necesariamente que una membrana celular intacta sea viable o cultivable" (Joux y Lebaron, 2000; Konings *et al*, 2002; Lahtinen *et al*, 2006) y "no está claro si las diferencias observadas entre ambas técnicas microbiológicas son debidas a que

las bacterias adoptan un estado activo pero no cultivable" (*Hoefel et al, 2003*).

No obstante, también existen algunos inconvenientes asociados a la microscopía de epifluorescencia que dificultan la cuantificación bacteriana, como la coagregación bacteriana (incluso después de homogeneizar la muestra), o la tinción de elementos celulares o de material contaminante (*Nadkarni et al, 2002*). Incluso, hay autores que opinan que el examen microscópico de las bacterias teñidas con la solución de fluorescencia es una tarea tediosa, que consume gran cantidad de tiempo y por tanto poco indicada para analizar un gran número de muestras (*Singh, 2006*). En este sentido, un objetivo interesante sería analizar si la sensibilidad de la detección bacteriana sobre la flora salival con la solución de fluorescencia SYTO 9/YP podría incrementarse con el empleo de otras técnicas de fluorescencia como el microscopio de barrido láser confocal, la citometría de flujo o el lector de microplaca de fluorescencia. Otros problemas asociados a la solución SYTO 9/YP incluyen: el daltonismo que afecta al 8-12% de los varones y casi al 1% de las mujeres (*Hope et al, 2002*); la posible influencia del estado fisiológico de la bacteria sobre las propiedades de la tinción (fase de crecimiento exponencial *versus* fase estacionaria) (*Berney et al, 2007*); un grado significativamente mayor de "fijación no-específica" a los componentes de la muestra y mayor "fondo de fluorescencia" con respecto a otros fluorocromos (*Biggerstaff et al, 2006*); o la detección de colores intermedios (amarillo o naranja) de interpretación desconocida (*Berney et al, 2007*). Se ha especulado que la presencia de estos colores intermedios podría ser consecuencia de grados diferentes de alteración de la membrana celular (*Boulos et al, 1999; Berney et al, 2007*) o de la penetración lenta del SYTO 9 a través de membranas intactas (*Lehtinen et al, 2004*), especialmente de las bacterias Gram-negativas (*Berney et al, 2007*).

Consecuentemente, al tratarse la microscopía de epifluorescencia de una técnica observador-dependiente, resulta importante la determinación de las correlaciones intra- e inter-observador, cuyos valores fueron $\geq 0,85$.

Aunque algunos autores emplearon técnicas de epifluorescencia para el análisis de la flora salival (Weiger *et al*, 1997; Weiger *et al* 1998; Ihalin *et al*, 2003), no hemos encontrado ningún trabajo realizado por otros grupos de investigación en el que se aplicara la microscopía de epifluorescencia y la solución SYTO 9/YP para evaluar la actividad antimicrobiana *in vivo* de la CHX sobre la flora salival, por lo que la comparación de nuestros resultados con los obtenidos por otros autores que aplicaron técnicas de cultivo en placa debe ser interpretada con cautela.

Con la microscopía de epifluorescencia y la solución de diacetato de fluoresceína y bromuro de etidio, Weiger *et al* (Weiger *et al*, 1998) encontraron que aproximadamente el 85% de la flora salival es viable en condiciones basales. Estos resultados coinciden con los obtenidos en la presente serie (la viabilidad osciló entre el 92-93%).

De acuerdo con los resultados obtenidos por algunos autores con el empleo de técnicas de cultivo en placa (Pitten y Kramer, 1999; Herrera *et al*, 2003), en la presente serie el UE-agua provocó un descenso significativo en la viabilidad bacteriana a los 30 segundos post-aplicación (de un 10%) aunque de carácter transitorio.

Numerosos autores han constatado que UE-CHX 0,2% (10 mL/1 minuto) provocó un efecto antibacteriano inmediato con una reducción $\geq 90\%$ ($\geq 1 \log_{10}$ UFC/mL) en la concentración bacteriana salival con respecto a los valores basales (Jenkins *et al*, 1991; Reynolds *et al*, 1991; Simonsson *et al*, 1991; Moran *et al*, 1992; Moran *et al*, 1995) y su

sustantividad persiste como mínimo hasta 7 horas post-aplicación, con una reducción $\geq 90\%$ ($\geq 1 \log_{10}$ UFC/mL) (Jenkins *et al*, 1991; Reynolds *et al*, 1991; Moran *et al*, 1992; Moran *et al*, 1995). En la presente serie, el UE-CHX 0,2% provocó un descenso inmediato en el porcentaje de bacterias viables ($\geq 90\%$) y esta actividad antimicrobiana fue detectable hasta 7 horas post-aplicación (la reducción de la viabilidad fue del 14%). A diferencia de los resultados obtenidos en estudios previos basados en técnicas de cultivo en placa (Jenkins *et al*, 1991; Reynolds *et al*, 1991; Moran *et al*, 1992; Moran *et al*, 1995), en la presente serie se detectó una recuperación significativa de la viabilidad bacteriana en todas las tomas salivales post-enjuague en comparación a la obtenida a los 30 segundos tras la aplicación de la CHX al 0,2%.

5.2. EVALUACIÓN DE LA SUSTANTIVIDAD DE LA CLORHEXIDINA SOBRE LA FLORA SALIVAL Y EL BIOFILM DE PLACA DENTAL

Con respecto al tipo de aparato removible aplicado para recoger la placa dental supragingival, se han propuesto diferentes diseños que van desde el “Leeds *in situ* device” -un anillo de nailon con un sustrato de esmalte- (Wood *et al*, 1999; Wood *et al*, 2000; Watson *et al*, 2005; Robinson *et al*, 2006), a las férulas con muelles mandibulares bilaterales (Palmer *et al*, 2003; Diaz *et al*, 2006; Palmer *et al*, 2006; Chalmers *et al*, 2007). Las férulas de acrílico individualizadas han sido un recurso utilizado por numerosos autores (Arweiler *et al*, 2004; Auschill *et al*, 2001; Auschill *et al*, 2004; Auschill *et al*, 2005; Al-Ahmad *et al*, 2007; Arweiler *et al*, 2008). En el presente estudio también elaboramos férulas individualizadas, pero con un diseño particular para evitar el contacto y la alteración de la estructura del biofilm durante las maniobras de remoción y reposición de la férula (Tomás *et al*, 2010b).

Los sustratos sólidos más empleados en los estudios publicados sobre B-PD son el esmalte humano (Netuschil *et al*, 1998; Wood *et al*, 2000; Auschill *et al*, 2001; Palmer *et al*, 2003; Chalmers *et al*, 2007), el

esmalte y la dentina bovinos (Zaura-Arite et al, 2001; Al-Ahmad et al, 2007; Arweiler et al, 2008; Jung et al, 2010), la hidroxiapatita (Gu et al, 2005) y el vidrio pulido (Netuschil et al, 1998; Arweiler et al, 2004; Auschill et al, 2004; Auschill et al, 2005; Dige et al, 2009a). A pesar de que la rugosidad de la superficie del sustrato y su energía libre se consideran factores importantes para el crecimiento *in vivo* del B-PD (Auschill et al, 2004), Netuschil et al (Netuschil et al, 1998) no encontraron grandes diferencias en el grosor de un B-PD de 2 días formado sobre discos de esmalte o de vidrio. En estudios preliminares para establecer el diseño metodológico del presente trabajo, comprobamos que no existían diferencias significativas en el grosor ni la viabilidad bacteriana de un B-PD de 2 días, cuando utilizamos discos de vidrio o de hidroxiapatita. Sin embargo, cuando incorporamos discos de vinilo, el grosor del B-PD aumentó significativamente, pero a expensas de una masa hipocelular difícilmente valorable (datos no mostrados). Además, algunos autores recomiendan el uso de vidrio para evitar posibles alteraciones ópticas debidas a la conocida autofluorescencia del esmalte (Netuschil et al, 1998; Dige et al, 2007). Basándonos en esta propuesta y en nuestros resultados preliminares, en la presente investigación utilizamos discos de vidrio para analizar el crecimiento *in vivo* de un B-PD de 2 días.

En la mayoría de los artículos sobre B-PD, el tiempo durante el cual el aparato removible se mantiene en la cavidad oral es, en general, de 24-48 horas (Netuschil et al, 1998; Zaura-Arite et al, 2001; Arweiler et al, 2004; Auschill et al, 2004; Auschill et al, 2005), aunque dependiendo del B-PD que se pretenda analizar existe un rango muy amplio de temporalización que va desde 4 horas (Konishi et al, 2003; Palmer et al, 2003; Diaz et al, 2006; Palmer et al, 2006) hasta 7 días (Watson et al, 2005; Robinson et al, 2006; Al-Ahmad et al, 2007).

Auschill et al (*Auschill et al, 2004*) demostraron que el grosor medio de un B-PD de 48 horas no se alteraba por la posición del aparato removible dentro de la cavidad oral (región vestibular maxilar vs región vestibular mandibular) ni por la posición del disco (distal vs mesial; derecha vs izquierda). Además, Arweiler et al (*Arweiler et al, 2004*) observaron que en un B-PD de 48 horas, la localización del disco tampoco afectaba a los valores medios de vitalidad ni al patrón de viabilidad bacteriana. En estudios preliminares para establecer el diseño metodológico del presente trabajo, comprobamos que no existían diferencias significativas en el grosor ni la viabilidad bacteriana de un B-PD de 2 días, entre los discos colocados en el lado izquierdo y en el derecho, así como entre los situados en áreas posteriores (molares) y anteriores (canino-premolares). Sin embargo, cuando la zona expuesta del disco correspondía a vestibular, el grosor y la celularidad eran mayores que en los expuestos hacia lingual (datos no mostrados). Basándonos en la literatura previa y en nuestros resultados preliminares, en el presente trabajo diseñamos férulas individualizadas para el maxilar inferior que contenían varios discos con el área de lectura expuesta hacia vestibular; éstos se analizaron alternativamente de derecha a izquierda y en dirección disto-mesial.

Netuschil et al (*Netuschil et al, 1998*) sugirieron que el grosor del B-PD depende de cada sujeto y de la edad de la placa. Esta gran variabilidad interindividual en el grosor del B-PD ha sido posteriormente constatada por numerosos autores (*Auschill et al, 2001; Auschill et al, 2004; Dige et al, 2009a*). Esta observación también se corroboró en el presente trabajo, en el que el valor medio del grosor del B-PD fue de 20 μm con un rango comprendido entre 11,75 μm y 33,00 μm . En este sentido, Auschill et al (*Auschill et al, 2001*) afirmaron que el grosor del biofilm “depende del ritmo de formación de placa de los donantes individuales”.

En estudios previos realizados *in situ*, los valores medios de viabilidad bacteriana del B-PD de 2 y 3 días oscilaron entre 60 y 77%, respectivamente (Arweiler et al, 2004; Auschill et al, 2005; von Ohle et al, 2010). Del mismo modo, en el presente trabajo, la viabilidad media del B-PD fue del 77-78%. Es difícil establecer un patrón general de distribución de la vitalidad bacteriana, ya que se han descrito diferencias inter-individuales sustanciales (Zaura-Arite et al, 2001; von Ohle et al, 2010). En este sentido, entre los participantes del presente estudio, también encontramos diferencias en la viabilidad del B-PD, cuyos valores extremos fueron 62% y 94%. Sin embargo, Arweiler et al (Arweiler et al, 2004) sugirieron que el ambiente ecológico es relativamente constante y describieron diferentes patrones de identidad microbiana. En nuestra serie, a pesar de la gran variabilidad detectada en la distribución de la vitalidad bacteriana, se pudo identificar un patrón característico, con un porcentaje bajo de viabilidad en las capas más próximas al sustrato, que va aumentando hacia las capas más altas. Éste se corresponde con uno de los patrones descritos por Arweiler et al (Arweiler et al, 2004), en el que sobre las bacterias de la capa basal se superponen nuevas bacterias vivas o proliferan algunas bacterias aún vitales o cultivables, formando una nueva capa de B-PD vital. Este hallazgo confirma la importancia del material celular muerto en los estadios iniciales del acúmulo y desarrollo del B-PD, favoreciendo particularmente su crecimiento y protegiéndolo de los agentes antimicrobianos del medio oral (Netuschil et al, 1998; Auschill et al, 2001).

En contra de la idea -basada en estudios *in situ* utilizando microscopía electrónica- de que el biofilm tenía una arquitectura compacta (Listgarten et al, 1975; Listgarten, 1976; Nyvad y Kilian, 1987), el análisis mediante CLSM del B-PD *in situ* confirmó un modelo de arquitectura abierta y heterogénea, con un sistema complejo de canales y oquedades (Wood et al, 2000; Auschill et al, 2001; Zaura-

Arite et al, 2001; Auschill et al, 2004; Arweiler et al, 2004). Auschill et al (*Auschill et al, 2001*), describieron además unas “oquedades no teñidas con morfología de burbujas”, presumiblemente rellenas de matriz extracelular. En el presente estudio, el B-PD de 2 días presentó un modelo de arquitectura abierta y heterogénea en más del 90% de las muestras (especialmente en las capas superficial y en contacto con el sustrato), con presencia de canales y oquedades en un 30% de las mismas (especialmente en las capas intermedias) y estructuras tipo “burbuja” en al menos un 40% de las muestras (especialmente en las capas intermedias).

Aunque se han publicado numerosos trabajos sobre la actividad antimicrobiana de la CHX sobre el biofilm *in vitro* (*Kinniment et al, 1996b; Wilson et al, 1996; Pratten et al, 1998a; Wilson et al, 1998; Pratten y Wilson, 1999; Hope y Wilson, 2004*), los estudios *in situ* sobre los efectos de los agentes antimicrobianos en el B-PD, en intervalos de tiempo definidos, aplicando CLSM y técnicas de viabilidad bacteriana, son muy escasos. Estos trabajos pueden analizarse diferenciando entre los que evalúan el efecto antimicrobiano de una aplicación única (*Zaura-Arite et al, 2001; von Ohle et al, 2010*) y aquéllos que cuantifican el efecto antimicrobiano de múltiples aplicaciones (*Auschill et al, 2005; Arweiler et al, 2008*).

Hasta la fecha, sólo hemos encontrado 2 trabajos en los que se haya estudiado *in situ* el efecto antimicrobiano de la CHX sobre el B-PD después de una única aplicación y en ambos casos el tratamiento se practicó *ex vivo* (*Zaura-Arite et al, 2001; von Ohle et al, 2010*). Zaura-Arite et al (*Zaura-Arite et al, 2001*) fueron los primeros autores que analizaron dicho efecto con CHX al 0,2%, empleando como sustrato discos de dentina bovina que se sumergían en el antiséptico y en suero salino (solución control). Estos autores concluyeron que con la CHX se obtenían efectos bactericidas pequeños y superficiales sobre el B-PD,

sólo cuando su grosor no superaba las 65 μm . Cabe destacar, que los participantes en este estudio se cepillaban los dientes dos veces al día (sin los aparatos intraorales) con una pasta de FNa (Zaura-Arite *et al*, 2001) y esto pudo constituir un importante sesgo metodológico. En el presente trabajo, UE-agua provocó un aumento significativo de la viabilidad bacteriana (en torno a un 11% a los 30 segundos después del enjuague), lo que podría expresar un posible “efecto de lavado” del material celular muerto. En estudios preliminares para establecer el diseño metodológico del presente trabajo, comprobamos que la eficacia de la CHX al 0,2% en términos de grosor y de viabilidad bacteriana de un B-PD de 2 días, era mayor cuando se aplicaba en enjuague que al sumergir los discos (datos no mostrados). Von Ohle *et al* (von Ohle *et al*, 2010) examinaron el efecto antimicrobiano del tratamiento con CHX al 0,2% durante 1 y 10 minutos, sobre la flora bacteriana de un B-PD de 3 días enriquecido con sacarosa. En este trabajo, la CHX redujo significativamente la viabilidad bacteriana. En concordancia con estos resultados, en la presente serie el enjuague con CHX al 0,2% durante 30 segundos redujo significativamente la viabilidad del B-PD (78% en condiciones basales *versus* 5% a los 30 segundos de la aplicación de CHX).

Se ha sugerido que la “penetración” del agente antimicrobiano condiciona de forma importante su actividad en los B-PD *in situ*, cuando se analiza el efecto de una única aplicación (Arweiler *et al*, 2008). En el presente estudio, la CHX al 0,2% inactivó las bacterias desde la superficie del B-PD hasta la capas más próximas al sustrato, demostrando una eficacia similar en todas las regiones analizadas del B-PD, en contra de los resultados obtenidos por otros autores (Zaura-Arite *et al*, 2001; von Ohle *et al*, 2010). El ritmo y extensión de penetración del agente antimicrobiano depende de factores como la estructura y la composición del biofilm (Wood *et al*, 2000; Watson *et al*, 2005), y fundamentalmente de su grosor (Stewart, 2003), así como de

las características físico-químicas del soluto (Wood *et al*, 2000; Watson *et al*, 2005). Otro aspecto relevante es la penetración del soluto durante períodos de exposición breves (inferiores a 2 minutos), un factor todavía relativamente inexplorado (Watson *et al*, 2005). Von Ohle *et al* (von Ohle *et al*, 2010), emplearon un modelo de difusión simple para calcular las concentraciones de CHX en función de la profundidad y del tiempo de aplicación sobre un B-PD *in situ* de 3 días. Estos autores estimaron que aplicando CHX al 0,2% durante 1 minuto se consigue una concentración de CHX clínicamente relevante (0,1% o mayor) hasta una profundidad de 70 μm , mientras que si el grosor del biofilm se reduce a 30 μm , sólo se tardaría 12 segundos en alcanzar una concentración de CHX del 0,1% en la capa interna, lo cual podría justificar los resultados obtenidos en el presente estudio sobre la actividad antimicrobiana de la CHX al 0,2% en un B-PD de 2 días (con un grosor de B-PD limitado).

No hemos encontrado ningún trabajo en la literatura sobre el efecto antimicrobiano en el B-PD de una única aplicación de CHX, en términos de sustantividad del antiséptico y grosor del B-PD. En la presente serie, la actividad antimicrobiana de la CHX al 0,2% era todavía detectable 7 horas después del enjuague, momento en el cual la reducción de la viabilidad aún era del 46%. Se detectó una recuperación significativa de la viabilidad bacteriana en las muestras de biofilm recogidas post-enjuague a las 3, 5 y 7 horas, en comparación con la viabilidad a los 30 segundos después del enjuague con CHX (especialmente en la capa interna de biofilm a las 7 horas). Con respecto a la influencia de un enjuague de CHX al 0,2% sobre el grosor del B-PD, las mayores reducciones significativas con respecto a la basal se detectaron a las 5 y 7 horas después de la aplicación del antiséptico. El grosor medio del B-PD tras UE-CHX al 0,2% fue significativamente menor que el observado al efectuar UE-agua (a las 5

y 7 horas post-enjuague), lo que podría sugerir un posible efecto antiplaca derivado de una única aplicación del antiséptico.

Se ha sugerido, que el test de fluorescencia que emplea SYTO 9 y YP puede ser particularmente útil para analizar simultáneamente, en diferentes ecosistemas orales, el efecto de los antimicrobianos que alteran la integridad de la membrana citoplasmática (Tomás *et al*, 2009). Sin embargo, hasta la fecha no hemos encontrado ningún estudio en la literatura en el que se compare la sustantividad de la CHX en el B-PD y en saliva. En la técnica de microscopía de epifluorescencia empleada para el análisis de la flora salival, los valores de las correlaciones intra- e inter-observador fueron $> 0,85$. En situación basal, la viabilidad bacteriana del B-PD fue significativamente menor a la detectada en la flora salival, con una diferencia en el porcentaje de bacterias viables del 15% (77-78% y 92-93%, respectivamente).

Numerosos autores han demostrado que las bacterias que crecen *in vitro* en el grosor de un biofilm estructurado, pueden llegar a ser entre 10 y 1000 veces más resistentes a los tratamientos antimicrobianos que las que se desarrollan en fase planctónica (Costerton *et al*, 1995; Wilson *et al*, 1996; Pratten y Wilson, 1999; Palmer, 2010). En el presente estudio, las bacterias que proliferaron durante 2 días *in situ* formando el B-PD resultaron menos susceptibles al enjuague de CHX al 0,2% que aquéllas presentes en la flora salival; el porcentaje de viabilidad bacteriana a los 30 segundos fue de 5 y 1%, respectivamente. Sin embargo, el enjuague de CHX al 0,2% mostró una mayor sustantividad en el B-PD *de novo* que en la flora salival a las 5 y 7 horas después de la aplicación de la CHX (porcentajes de viabilidad del 25 y 32% vs 55 y 77%, respectivamente). Este hecho podría estar relacionado con el ritmo de crecimiento especialmente lento del B-PD (Nickel *et al*, 1985; Gristina *et al*, 1987; Costerton *et al*, 1999; Aparna y Yadav, 2008) o por la presencia de una arquitectura abierta del B-PD *in*

situ (Wood et al, 2000). En este sentido, aunque se ha asumido que las bacterias muertas y la generación de sustancias exopoliméricas impiden la rápida penetración de los antimicrobianos a través del biofilm, algunos autores sostienen que el B-PD podría tener cierta función de reservorio para los agentes antimicrobianos (van der Mei et al, 2006).

5.3. INFLUENCIA DEL RITMO CIRCADIANO EN LA SUSTANTIVIDAD DE LA CLORHEXIDINA SOBRE LA FLORA SALIVAL Y EL BIOFILM DE PLACA DENTAL

A partir del trabajo publicado por Schiött et al en 1970 (Schiött et al, 1970), la comunidad científica asumió que: "La sustantividad de la CHX persiste hasta las 12-14 horas después de su aplicación". Sin embargo, las series en las que se determinó la sustantividad *in vivo* de la CHX sobre la flora salival o el B-PD transcurridas más de 7 horas post-aplicación de este antiséptico son escasas, y la mayoría se limitaron a analizar muestras recogidas a las 24 horas post-aplicación (Addy y Wright, 1978; Dahlén, 1984; Netuschil et al, 1989). Con la finalidad de aportar resultados a este respecto, en el presente estudio se determinó la sustantividad *in vivo* de la CHX al 0,2% sobre ambos ecosistemas (flora salival y B-PD) a las 8, 10 y 12 horas después de realizar un único enjuague con este antiséptico.

Como ya hemos señalado, la solución de fluorescencia SYTO 9/YP se ha considerado especialmente útil para analizar la actividad antimicrobiana de la CHX (Hope y Wilson, 2004; Filoche et al, 2007). En base a los resultados de nuestro grupo, que demostraron que la microscopía de epifluorescencia empleando esta tinción dual es una técnica eficaz para cuantificar la actividad antibacteriana de la CHX sobre la flora salival en "tiempo real" (Tomás et al, 2009), éste fue uno de los recursos técnicos empleados en el presente estudio. Al ser considerada una técnica observador-dependiente (Tomás et al, 2009),

resulta importante la determinación de las correlaciones intra- e inter-observador, cuyos valores en el presente trabajo fueron $> 0,9$.

En la presente serie, la CHX al 0,2% ejerció una importante acción antimicrobiana, ya que en comparación con los valores basales previamente descritos (*Tomás et al, 2009*), esta actividad persistió hasta las 10-12 horas post-aplicación con una reducción de la viabilidad del 19% para el ENJ-CHX-diurno y del 33% para el ENJ-CHX-nocturno. Probablemente estos resultados estén condicionados por las férulas porta-discos que llevaban los participantes, ya que éstas pueden favorecer la retención de la CHX, como se ha demostrado en los pacientes con prótesis removibles (*Bonesvoll y Olsen, 1974*), y por consiguiente potenciar su efecto antibacteriano. A diferencia de los resultados obtenidos en estudios previos basados en técnicas de cultivo en placa (*Jenkins et al, 1991; Reynolds et al, 1991; Moran et al, 1992; Moran et al, 1995*), y coincidiendo con investigaciones previas realizadas por nuestro grupo (*Tomás et al, 2009; Cousido et al, 2010*), en la presente serie se detectó una recuperación progresiva de la viabilidad bacteriana en las tomas salivales conforme se incrementaba el número de horas transcurridas desde la realización del enjuague con CHX (8 horas vs 10 horas vs 12 horas), que resultó estadísticamente significativa en la mayoría de las comparaciones.

Se ha demostrado que la retención de la CHX en la cavidad oral está condicionada por factores extrínsecos asociados al enjuague (*Bonesvoll y Olsen, 1974*). Sin embargo, no hemos encontrado ningún trabajo en la literatura sobre la influencia del momento de aplicación del enjuague (día vs noche) en la sustentividad *in vivo* de la CHX sobre la flora salival. En la presente serie, la duración de la actividad antimicrobiana sobre la flora salival después del ENJ-CHX-diurno fue significativamente más corta que la originada por el ENJ-CHX-nocturno (las diferencias en los porcentajes de viabilidad bacteriana oscilaron

entre 37% a las 8 horas post-aplicación y 26% a las 12 horas post-aplicación). En nuestra opinión, la mayor sustentividad asociada al ENJ-CHX-nocturno sobre la flora salival podría atribuirse al ritmo circadiano de secreción salival, ya que está demostrado que durante el sueño se produce una reducción significativa del flujo salival hasta hacerse prácticamente inexistente (Dawes, 1972; Dawes, 2008). Esto conlleva una disminución del ritmo de aclaramiento salival, lo que a su vez prolonga la persistencia del antiséptico residual en la saliva. Como consecuencia, existe una disminución de los efectos protectores de la saliva sobre la cavidad oral y simultáneamente un descenso en el aporte de nutrientes, lo que también condiciona directamente el crecimiento bacteriano (Craig y Stitzel, 2003; Dawes, 2008).

Como ya hemos comentado previamente, la aplicación de la microscopía confocal, incorporando tinciones de fluorescencia, se considera la metodología más adecuada para estudiar *in vivo* la arquitectura y fisiología del biofilm dental, y el efecto antibacteriano de los antisépticos orales (Wood *et al*, 2000; Arweiler *et al*, 2004). Esta metodología exige el crecimiento previo del biofilm sobre un sustrato específico, que se incorpora a un aparato removible intraoral de diseño variable (Wood *et al*, 2000; Arweiler *et al*, 2004; Sreenivasan *et al*, 2004; Watson *et al*, 2005). Al igual que en trabajos previos desarrollados por nuestro grupo (Tomás *et al*, 2010b), en el presente estudio, elaboramos férulas individualizadas adaptadas a la arcada inferior de cada participante, en las que incorporamos discos de vidrio como sustrato sólido y soporte del B-PD.

En la literatura revisada no hemos encontrado ningún estudio *in vivo* en el que se determine el efecto antibacteriano de la CHX al 0,2% sobre la placa bacteriana “no desestructurada”. Recientemente, nuestro grupo evaluó el efecto inmediato y la sustentividad *in vivo* hasta 7 horas después de la aplicación de un único enjuague de CHX al 0,2% (10

mL/30 segundos) sobre el biofilm intacto de 48 horas. En contraste con la viabilidad basal (77-78%), las frecuencias detectadas en las posteriores determinaciones post-enjuague resultaron significativamente inferiores (a los 30 segundos= 5%, a la hora= 16%, a las 3 horas= 36%, a las 5 horas= 25% y a las 7 horas= 32%). En consonancia con estos resultados, en la presente serie, a las 8 horas post-enjuague se detectó un porcentaje de viabilidad en torno al 36-40%, persistiendo este efecto antibacteriano constante hasta 12 horas después de la aplicación de la CHX. A diferencia de lo que acontece en la flora salival, en el biofilm no se detectó una recuperación progresiva del ecosistema ni diferencias en la viabilidad entre los 2 tipos de enjuagues de CHX aplicados (ENJ-CHX-diurno vs ENJ-CHX-nocturno), lo que permite ratificar la especulación planteada por autores previos sobre la posible función reservorio asociada a la estructura del biofilm “*de novo*” (*van der Mei et al, 2008*). En contraste con el grosor medio del biofilm de 48 horas, previamente descrito por nuestro grupo, en la presente serie estos valores fueron inferiores, lo que podría sugerir un cierto “efecto anti-placa” después de practicar un único enjuague de CHX e independiente del momento de aplicación (diurna vs nocturna).

Aunque se ha afirmado que la actividad antibacteriana de la CHX sobre la flora salival no es extrapolable a su acción sobre las bacterias presentes en la placa bacteriana (*Netuschil et al, 1989*), la saliva representa un “medio de diseminación” de los microorganismos orales de un nicho ecológico a otro (*Collaert et al, 1992*). Sekino et al (*Sekino et al, 2003*) demostraron que la concentración de bacterias salivales presentes después de la aplicación de diferentes protocolos de CHX puede condicionar los niveles de placa bacteriana durante las primeras fases de su formación. A pesar de la interconexión existente entre ambos ecosistemas y la importancia de su estudio, muy pocos autores han investigado simultáneamente la actividad antibacteriana ejercida después de una única aplicación de CHX al 0,2% sobre la saliva y otras

biopelículas orales (*Sreenivasan y Gittins, 2004a*). En consonancia con los resultados previos descritos por nuestro grupo, en la presente serie los porcentajes de viabilidad bacteriana detectados a las 8, 10 y 12 horas después del ENJ-CHX-diurno fueron significativamente superiores en la flora salival que en el B-PD. Por el contrario, después del ENJ-CHX-nocturno el porcentaje de viabilidad a las 8 horas post-aplicación fue significativamente inferior en la flora salival que en el B-PD y sólo resultó superior a las 12 horas post-aplicación.

6. CONCLUSIONES

- 1^a. La microscopía de epifluorescencia con la solución LIVE/DEAD® BacLight™ es un método eficaz que permite la cuantificación en “tiempo real” de la viabilidad bacteriana de la flora salival y que podría resultar particularmente útil para evaluar el efecto de determinados agentes antimicrobianos en diferentes ecosistemas orales simultáneamente.
- 2^a. El biofilm de placa dental “no desestructurado” de 48 horas de evolución es más resistente que la flora salival a la acción antibacteriana inmediata de un único enjuague de clorhexidina al 0,2%. Sin embargo, la sustantividad de la clorhexidina en el biofilm de placa dental es mayor que en la saliva, lo que confirma el ritmo de crecimiento especialmente lento y la posible influencia de la arquitectura abierta del biofilm *de novo*.
- 3^a. Tras la aplicación de un único enjuague de clorhexidina al 0,2%, la viabilidad bacteriana de la flora salival se recupera progresivamente, aunque es más eficaz la práctica de un enjuague nocturno. En el biofilm de placa dental la viabilidad bacteriana se recupera hasta 3 horas después del enjuague y después se mantiene constante al menos hasta 12 horas, independientemente del momento de aplicación del enjuague. Estos resultados corroboran el mayor dinamismo fisiológico de la flora salival y la posible “función reservorio” del biofilm *de novo*.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. **Addy M, Wright R.** Comparison of the *in vivo* and *in vitro* antibacterial properties of povidone iodine and chlorhexidine gluconate mouthrinses. *J Clin Periodontol* 1978; 5: 198-205.
2. **Addy M, Jenkins S, Newcombe R.** The effect of some chlorhexidine-containing mouthrinses on salivary bacterial counts. *J Clin Periodontol* 1991; 18: 90-93.
3. **Al-Ahmad A, Wunder A, Auschill TM, Follo M, Braun G, Hellwig E, Arweiler NB.** The *in vivo* dynamics of *Streptococcus* spp., *Actinomyces naeslundii*, *Fusobacterium nucleatum* and *Veillonella* spp. in dental plaque biofilm as analysed by five-colour multiplex fluorescence *in situ* hybridization. *J Med Microbiol* 2007; 56: 681-687.
4. **Al-Ahmad A, Roth D, Wolkewitz M, Wiedmann-Al-Ahmad M, Follo M, Ratka-Kruger P, Deimling D, Hellwig E, Hannig C.** Change in diet and oral hygiene over an 8-week period: effects on oral health and oral biofilm. *Clin Oral Investig* 2010; 14: 391-396.
5. **Anwar H, Strap JL, Costerton JW.** Establishment of aging biofilms: possible mechanism of bacterial resistance to antimicrobial therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 1347-1351.
6. **Aparna MS, Yadav S.** Biofilms: microbes and disease. *Braz J Infect Dis* 2008; 12: 526-530.
7. **Arweiler NB, Hellwig E, Sculean A, Hein N, Auschill TM.** Individual vitality pattern of *in situ* dental biofilms at different locations in the oral cavity. *Caries Res* 2004; 38: 442-447.

8. **Arweiler NB, Boehnke N, Sculean A, Hellwig E, Auschill TM.** Differences in efficacy of two commercial 0.2% chlorhexidine mouthrinse solutions: a 4-days plaque re-growth study. *J Clin Periodontol* 2006; 33: 334-339.
9. **Arweiler NB, Lenz R, Sculean A, Al-Ahmad A, Hellwig E, Auschill TM.** Effect of food preservatives on *in situ* biofilm formation. *Clin Oral Investig* 2008; 12: 203-208.
10. **Auschill TM, Arweiler NB, Netuschil L, Brex M, Reich E, Sculean A.** Spatial distribution of vital and dead microorganisms in dental biofilms. *Arch Oral Biol* 2001; 46: 471-476.
11. **Auschill TM, Arweiler NB, Brex M, Reich E, Sculean A, Netuschil L.** The effect of dental restorative materials on dental biofilm. *Eur J Oral Sci* 2002; 110: 48-53.
12. **Auschill TM, Hellwig E, Sculean A, Hein N, Arweiler NB.** Impact of the intraoral location on the rate of biofilm growth. *Clin Oral Investig* 2004; 8: 97-101.
13. **Auschill TM, Hein N, Hellwig E, Follo M, Sculean A, Arweiler NB.** Effect of two antimicrobial agents on early *in situ* biofilm formation. *J Clin Periodontol* 2005; 32: 147-152.
14. **Baehni PC, Takeuchi Y.** Anti-plaque agents in the prevention of biofilm-associated oral diseases. *Oral Dis* 2003; 9: 23-29.
15. **Balbuena L, Stambaugh KI, Ramirez SG, Yeager C.** Effects of topical oral antiseptic rinses on bacterial counts of saliva in healthy human subjects. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1998; 118: 625-629.

16. **Barcat JA.** Biofilms. *Medicina (B Aires)* 2005; 65: 369-372.

17. **Bassler BL.** How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Curr Opin Microbiol* 1999; 2: 582-587.

18. **Beckers HJ, van der Hoeven JS.** The effects of mutual interaction and host diet on the growth rates of the bacteria *Actinomyces viscosus* and *Streptococcus mutans* during colonization of tooth surfaces in di-associated gnotobiotic rats. *Arch Oral Biol* 1984; 29: 231-236.

19. **Beighton D, Smith K, Hayday H.** The growth of bacteria and the production of exoglycosidic enzymes in the dental plaque of macaque monkeys. *Arch Oral Biol* 1986; 31: 829-835.

20. **Berney M, Hammes F, Bosshard F, Weilenmann HU, Egli T.** Assessment and interpretation of bacterial viability by using the LIVE/DEAD BacLight Kit in combination with flow cytometry. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73: 3283-3290.

21. **Bernimoulin JP.** Recent concepts in plaque formation. *J Clin Periodontol* 2003; 30: 7-9.

22. **Beyth N, Yudovin-Farber I, Perez-Davidi M, Domb AJ, Weiss EI.** Polyethyleneimine nanoparticles incorporated into resin composite cause cell death and trigger biofilm stress *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 22038-22043.

23. **Biggerstaff JP, Le Puil M, Weidow BL, Prater J, Glass K, Radosevich M, White DC.** New methodology for viability testing in environmental samples. *Mol Cell Probes* 2006; 20: 141-146.

24. **Black GV.** Dr. Black's conclusions reviewed again. *Dent Cosmos* 1898; 40: 440-451.
25. **Boles BR, Thoendel M, Singh PK.** Self-generated diversity produces "insurance effects" in biofilms communities. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 16630-16635.
26. **Bonesvoll P, Olsen I.** Influence of teeth, plaque and dentures on the retention of chlorhexidine in the human oral cavity. *J Clin Periodontol* 1974; 1: 214-221.
27. **Bos R, van der Mei HC, Busscher HJ.** Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions – its mechanisms and methods for study. *FEMS Microbiol Rev* 1999; 23: 179-230.
28. **Boulos L, Prévost M, Barbeau B, Coallier J, Desjardins R.** LIVE/DEAD BacLight: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *J Microbiol Methods* 1999; 37: 77-86.
29. **Bowden GH, Li YH.** Nutritional influences on biofilm development. *Adv Dent Res* 1997; 11: 81-99.
30. **Bradshaw DJ, McKee AS, Marsh PD.** Prevention of population shifts in oral microbial communities *in vitro* by low fluoride concentrations. *J Dent Res* 1990; 69: 436-441.
31. **Bradshaw DJ, Homer KA, Marsh PD, Beighton D.** Metabolic cooperation in oral microbial communities during growth on mucin. *Microbiology* 1994; 140: 3407-3412.

32. **Bradshaw DJ, Marsh PD, Allison C, Schilling KM.** Effect of oxygen, inoculum composition and flow rate on development of mixed culture oral biofilms. *Microbiology* 1996a; 142: 623-629.
33. **Bradshaw DJ, Marsh PD, Schilling KM, Cummins D.** A modified chemostat system to study the ecology of oral biofilms. *J Appl Bacteriol* 1996b; 80: 124-130.
34. **Bradshaw DJ, Marsh PD, Hodgson RJ, Visser JM.** Effects of glucose and fluoride on competition and metabolism within *in vitro* dental bacterial communities and biofilms. *Caries Res* 2002; 36: 81-86.
35. **Brecx M, Theilade J, Attström R.** An ultrastructural quantitative study of the significance of microbial multiplication during early dental plaque growth. *J Periodontal Res* 1983; 18: 177-186.
36. **Brown MR, Allison DG, Gilbert P.** Resistance of bacterial biofilms to antibiotics: a growth-rate related effect? *J Antimicrob Chemother* 1988; 22: 777-780.
37. **Buckner RY, Kayrouz GA, Briner W.** Reduction of oral microbes by a single chlorhexidine rinse. *Compendium* 1994; 15: 512, 514, 516.
38. **Busscher HJ, Bos R, van der Mei HC.** Initial microbial adhesion is a determinant for the strenght of biofilm adhesion. *FEMS Microbiol Lett* 1995; 128: 229-234.
39. **Chalmers NI, Palmer RJ Jr, Du-Thumm L, Sullivan R, Shi W, Kolenbrander PE.** Use of quantum dot luminescent probes to

achieve single-cell resolution of human oral bacteria in biofilms. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73: 630-636.

40. **Cisar JO, Kolenbrander PE, McIntire FC.** Specificity of coaggregation reactions between human oral streptococci and strains of *Actinomyces viscosus* or *Actinomyces naeslundii*. *Infect Immun* 1979; 24: 742-752.
41. **Collaert B, Edwardsson S, Attström R, Hase JC, Aström M, Møvert R.** Rinsing with delmopinol 0.2% and chlorhexidine 0.2%: short-term effect on salivary microbiology, plaque, and gingivitis. *J Periodontol* 1992; 63: 618-625.
42. **Costerton JW.** Overview of microbial biofilms. *J Ind Microbiol* 1995; 15: 137-140.
43. **Costerton JW, Lewandowski Z.** The biofilm lifestyle. *Adv Dent Res* 1997; 11: 192-195.
44. **Costerton JW, Stewart PS.** Battling biofilms. *Sci Am* 2001; 285: 74-81.
45. **Costerton JW, Geesey GG, Cheng KJ.** How bacteria stick. *Sci Am* 1978; 238: 86-95.
46. **Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, Marrie TJ.** Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol* 1987; 41: 435-464.
47. **Costerton JW, Lewandowski Z, DeBeer D, Caldwell D, Korber D, James G.** Biofilms, the customized microniche. *J Bacteriol* 1994; 176: 2137-2142.

48. **Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM.** Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 1995; 49: 711-745.
49. **Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP.** Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999; 284: 1318-1322.
50. **Cousido MC, Tomás Carmona I, García-Caballero L, Limeres J, Álvarez M, Diz P.** *In vivo* substantivity of 0,12% and 0,2% chlorhexidine mouthrinses on salivary bacteria. *Clin Oral Investig* 2010; 14: 397-402.
51. **Cowan SE, Gilbert E, Liepmann D, Keasling JD.** Commensal interactions in a dual-species biofilm exposed to mixed organic compounds. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66: 4481-4485.
52. **Craig R, Stitzel RE.** Modern pharmacology with clinical applications, 6th edition. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2003.
53. **Critchley P.** The breakdown of the carbohydrate and protein matrix of dental plaque. *Caries Res* 1969; 3: 249-265.
54. **Dahlén G.** Effect of antimicrobial mouthrinses on salivary microflora in healthy subjects. *Scand J Dental Res* 1984; 92: 38-42.
55. **Daneshmand N, Jorgensen MG, Nowzari H, Morrison JL, Slots J.** Initial effect of controlled release chlorhexidine on subgingival microorganisms. *J Periodontal Res* 2002; 37: 375-379.

56. **Davies D.** Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov* 2003; 2: 114-122.
57. **Dawes C.** Circadian rhythms in human salivary flow rate and composition. *J Physiol* 1972; 220: 529-545.
58. **Dawes C.** Salivary flow patterns and the health of hard and soft oral tissues. *J Am Dent Assoc* 2008; 139 Suppl: 18S-24S.
59. **de Beer D, Stoodley P.** Relation between the structure of an aerobic biofilm and transport phenomena. *Water Sci Technol* 1995; 32: 11-18.
60. **de Beer D, Stoodley P, Roe F, Lewandowski Z.** Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport. *Biotechnol Bioeng* 1994; 43: 1131-1138.
61. **Decker EM, Weiger R, von Ohle C, Wiech I, Brex M.** Susceptibility of planktonic *versus* attached *Streptococcus sanguinis* cells to chlorhexidine. *Clin Oral Investig* 2003; 7: 98-102.
62. **Decker EM, von Ohle C, Weiger R, Wiech I, Brex M.** A synergistic chlorhexidine/chitosan combination for improved antiplaque strategies. *J Periodontal Res* 2005; 40: 373-377.
63. **Decker EM, Maier G, Axmann D, Brex M, von Ohle C.** Effect of xylitol/chlorhexidine *versus* xylitol or chlorhexidine as single rinses on initial biofilm formation of cariogenic streptococci. *Quintessence Int* 2008; 39: 17-22.

64. **Demuth DR, Duan Y, Brooks W, Holmes AR, McNab R, Jenkinson HF.** Tandem genes encode cell-surface polypeptides SspA and SspB which mediate adhesion of the oral bacterium *Streptococcus gordonii* to human and bacterial receptors. *Mol Microbiol* 1996; 20: 403-413.

65. **Deng DM, Buijs MJ, ten Cate JM.** The effects of substratum on the pH response of *Streptococcus mutans* biofilms and on the susceptibility to 0.2% chlorhexidine. *Eur J Oral Sci* 2004; 112: 42-47.

66. **Diaz PI, Chalmers NI, Rickard AH, Kong C, Milburn CL, Palmer RJ Jr, Kolenbrander PE.** Molecular characterization of subject-specific oral microflora during initial colonization of enamel. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72: 2837-2848.

67. **Dige I, Nilsson H, Kilian M, Nyvad B.** *In situ* identification of streptococci and other bacteria in initial dental biofilm by confocal laser scanning microscopy and fluorescence *in situ* hybridization. *Eur J Oral Sci* 2007; 115: 459-467.

68. **Dige I, Nyengaard JR, Kilian M, Nyvad B.** Application of stereological principles for quantification of bacteria in intact dental biofilms. *Oral Microbiol Immunol* 2009a; 24: 69-75.

69. **Dige I, Raarup MK, Nyengaard JR, Kilian M, Nyvad B.** *Actinomyces naeslundii* in initial dental biofilm formation. *Microbiology* 2009b; 155: 2116-2126.

70. **Dongari-Bagtzoglou A.** Pathogenesis of mucosal biofilm infections: challenges and progress. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2008; 6: 201-208.

71. **Donlan RM, Costerton JW.** Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 167-193.
72. **Douglas CW.** Bacterial-protein interactions in the oral cavity. *Adv Dent Res* 1994; 8: 254-262.
73. **Egland PG, Du LD, Kolenbrander PE.** Identification of independent *Streptococcus gordonii* SspA and SspB functions in coaggregation with *Actinomyces naeslundii*. *Infect Immun* 2001; 69: 7512-7516.
74. **Eick S, Selmann T, Pfister W.** Efficacy of antibiotics to strains of periodontopathogenic bacteria within a single species biofilm - an *in vitro* study. *J Clin Periodontol* 2004; 31: 376-383.
75. **Elliott D, Pratten J, Edwards M, Crowther J, Petrie A, Wilson M.** Bacterial biofilm development on hydroxyapatite-coated glass. *Curr Microbiol* 2005; 51: 41-45.
76. **Elworthy A, Greenman J, Doherty FM, Newcombe RG, Addy M.** The substantivity of a number of oral hygiene products determined by the duration of effects on salivary bacteria. *J Periodontol* 1996; 67: 572-576.
77. **Filoché SK, Coleman MJ, Angker L, Sissons CH.** A fluorescence assay to determine the viable biomass of microcosm dental plaque biofilms. *J Microbiol Methods* 2007; 69: 489-496.

78. **Fine DH.** Mouthrinses as adjuncts for plaque and gingivitis management. A status report for the American Journal of Dentistry. *Am J Dent* 1988; 1: 259-263.

79. **Fine DH, Furgang D, Barnett ML.** Comparative antimicrobial activities of antiseptic mouthrinses against isogenic planktonic and biofilm forms of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Clin Periodontol* 2001; 28: 697-700.

80. **Finney M, Walker JT, Marsh PD, Brading MG.** Antimicrobial effects of a novel Triclosan/zinc citrate dentifrice against mixed culture oral biofilms. *Int Dent J* 2003; 53: 371-378.

81. **Foley I, Gilbert P.** *In vitro* studies of the activity of glycopeptide combinations against *Enterococcus faecalis* biofilms. *J Antimicrob Chemother* 1997; 40: 667-672.

82. **Foster JS, Kolenbrander PE.** Development of a multispecies oral bacterial community in a saliva-conditioned flow cell. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70: 4340-4348.

83. **Frías J, Alsina M.** Nuevas perspectivas en biofilms dentales. *Periodoncia* 2001; 11: 23-32.

84. **Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP.** Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* 1994; 176: 269-275.

85. **García-Caballero L, Carmona IT, González MC, Posse JL, Taboada JL, Dios PD.** Evaluation of the substantivity in saliva of different forms of application of chlorhexidine. *Quintessence Int* 2009; 40: 141-144.

86. **Gibbons RJ, Banghart SB.** Synthesis of extracellular dextran by cariogenic bacteria and its presence in human dental plaque. *Arch Oral Biol* 1967; 12: 11-23.
87. **Gilbert P, Das J, Foley I.** Biofilm susceptibility to antimicrobials. *Adv Dent Res* 1997; 11: 160-167.
88. **Gilbert P, Maira-Litran T, McBain AJ, Rickard AH, Whyte FW.** The physiology and collective recalcitrance of microbial biofilm communities. *Adv Microb Physiol* 2002; 46: 202-256.
89. **Gu F, Lux R, Du-Thumm L, Stokes I, Kreth J, Anderson MH, Wong DT, Wolinsky L, Sullivan R, Shi W.** *In situ* and non-invasive detection of specific bacterial species in oral biofilms using fluorescently labeled monoclonal antibodies. *J Microbiol Methods* 2005; 62: 145-160.
90. **Guggenheim B, Giertsen E, Schüpbach P, Shapiro S.** Validation of an *in vitro* biofilm model of supragingival plaque. *J Dent Res* 2001a; 80: 363-370.
91. **Guggenheim M, Shapiro S, Gmür R, Guggenheim B.** Spatial arrangements and associative behavior of species in an *in vitro* oral biofilm model. *Appl Environ Microbiol* 2001b; 67: 1343-1350.
92. **Gould SJ.** La grandeza de la vida. Capítulo 14. La expansión de la excelencia de Platón a Darwin. Crítica, Barcelona, 1997, pp 178-229.
93. **Gristina AG, Hobgood CD, Webb LX, Myrvik QN.** Adhesive colonization of biomaterials and antibiotic resistance. *Biomaterials* 1987; 8: 423-426.

94. **Haffajee AD, Socransky SS.** Introduction to microbial aspects of periodontal biofilm communities, development and treatment. *Periodontol 2000* 2006; 42: 7-12.
95. **Hall-Stoodley L, Stoodley P.** Envolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiol* 2009; 11: 1034-1043.
96. **Handley PS, Sutton NA, Hughes N.** Problems associated with electron microscopy of biofilms. En: Bacterial biofilms and their control in medicine and industry. Wimpenny J, Nichols W, Stickler D, Lappin-Scott H (eds). Cardiff: Bioline, Cardiff, 1993, pp 61-66.
97. **Hannig M.** Transmission electron microscopy of early plaque formation on dental materials *in vivo*. *Eur J Oral Sci* 1999; 107: 55-64.
98. **Hannig C, Hannig M.** The oral cavity-a key system to understand substratum-dependent bioadhesion on solid surfaces in man. *Clin Oral Investig* 2009; 13: 123-139.
99. **Hannig C, Hannig M, Rehmer O, Braun G, Hellwig E, Al-Ahmad A.** Fluorescence microscopic visualization and quantification of initial bacterial colonization on enamel *in situ*. *Arch Oral Biol* 2007; 52: 1048-1056.
100. **Helmerhorst EJ, Hodgson R, van't Hof W, Veerman EC, Allison C, Nieuw Amerongen Av.** The effects of histatin-derived basic antimicrobial peptides on oral biofilms. *J Dent Res* 1999; 78: 1245-1250.

101. **Herrera D, Roldán S, Santacruz I, Santos S, Masdevall M, Sanz M.** Differences in antimicrobial activity of four commercial 0.12% chlorhexidine mouthrinse formulations: an *in vitro* contact test and salivary bacterial counts study. *J Clin Periodontol* 2003; 30: 307-314.
102. **Hoefel D, Grooby WL, Monis PT, Andrews S, Saint CP.** Enumeration of water-borne bacteria using viability assays and flow cytometry: a comparison to culture-based techniques. *J Microbiol Methods* 2003; 55: 585-597.
103. **Hope CK, Wilson M.** Measuring the thickness of an outer layer of viable bacteria in an oral biofilm by viability mapping. *J Microbiol Methods* 2003; 54: 403-410.
104. **Hope CK, Wilson M.** Analysis of the effects of chlorhexidine on oral biofilm vitality and structure based on viability profiling and an indicator of membrane integrity. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 1461-1468.
105. **Hope CK, Wilson M.** Biofilm structure and cell vitality in a laboratory model of subgingival plaque. *J Microbiol Methods* 2006; 66: 390-398.
106. **Hope CK, Clements D, Wilson M.** Determining the spatial distribution of viable and nonviable bacteria in hydrated microcosm dental plaques by viability profiling. *J Appl Microbiol* 2002; 93: 448-455.
107. **Hoyle BD, Williams LJ, Costerton JW.** Production of mucoid exopolysaccharide during development of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Infect Immun* 1993; 61: 777-780.

108. **Ihalin R, Nuutila J, Loimaranta V, Lenander M, Tenovuo J, Lilius EM.** Susceptibility of *Fusobacterium nucleatum* to killing by peroxidase-iodide-hydrogen peroxide combination in buffer solution and in human whole saliva. *Anaerobe* 2003; 9: 23-30.
109. **Jayaraman A, Wood TK.** Bacterial quorum sensing: signals, circuits, and implications for biofilms and disease. *Annu Rev Biomed Eng* 2008; 10: 145-167.
110. **Jefferson KK, Cerca N.** Bacterial-bacterial cell interactions in biofilms: detection of polysaccharide intercellular adhesins by blotting and confocal microscopy. *Methods Mol Biol* 2006; 341: 119-126.
111. **Jenkins S, Addy M, Newcombe R.** Triclosan and sodium lauryl sulphate mouthwashes (I). Effects on salivary bacterial counts. *J Clin Periodontol* 1991; 18: 140-144.
112. **Jenkins S, Addy M, Wade W, Newcombe RG.** The magnitude and duration of the effects of some mouthrinse products on salivary bacterial counts. *J Clin Periodontol* 1994; 21: 397-401.
113. **Joux F, Lebaron P.** Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level. *Microbes Infect* 2000; 2: 1523-1535.
114. **Jung DJ, Al-Ahmad A, Follo M, Spitzmüller B, Hoth-Hannig W, Hannig M, Hannig C.** Visualization of initial bacterial colonization on dentine and enamel *in situ*. *J Microbiol Methods* 2010; 81: 166-174.

- 115. **Kage A, Bernimoulin JP.** 4th European symposium on the application of saliva in clinical practice and research. *Eur J Oral Sci* 1995; 103: S1-S41.
- 116. **Kilian M, Larsen MJ, Fejerskov O, Thylstrup A.** Effects of fluoride on the initial colonization of teeth in vivo. *Caries Res* 1979; 13: 319-329.
- 117. **Kinniment SL, Wimpenny JW, Adams D, Marsh PD.** Development of a steady-state oral microbial biofilm community using the constant-depth film fermenter. *Microbiology* 1996a; 142: 631-638.
- 118. **Kinniment SL, Wimpenny JW, Adams D, Marsh PD.** The effect of chlorhexidine on defined, mixed culture oral biofilms grown in a novel model system. *J Appl Bacteriol* 1996b; 81: 120-125.
- 119. **Kolenbrander PE.** Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. *Annu Rev Microbiol* 2000; 54: 413-437.
- 120. **Kolenbrander PE, London J.** Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. *J Bacteriol* 1993; 175: 3247-3252.
- 121. **Kolenbrander PE, Andersen RN, Kazmerzak K, Wu R, Palmer RJ Jr.** Spatial organization of oral bacteria in biofilms. *Methods Enzymol* 1999; 310: 322-332.
- 122. **Kolenbrander PE, Andersen RN, Kazmerzak KM, Palmer RJ.** Coaggregation and coadhesion in oral biofilms. En: Community structure and co-operation in biofilms. Society for General

Microbiology Symposium 59. Allison DG, Gilbert P, Lappin-Scott HM, Wilson M (eds). Cambridge University Press, Cambridge, 2000, pp 65-85.

123. **Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Egland PG, Foster JS, Palmer RJ Jr.** Communication among oral bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 2002; 66: 486-505.
124. **Kolenbrander PE, Palmer RJ Jr, Rickard AH, Jakubovics NS, Chalmers NI, Diaz PI.** Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontol 2000* 2006; 42: 47-79.
125. **König J, Storcks V, Kocher T, Bössmann K, Plagmann HC.** Anti-plaque effect of tempered 0.2% chlorhexidine rinse: An *in vivo* study. *J Clin Periodontol* 2002; 29: 207-210.
126. **Konings WN, Albers SV, Koning S, Driessen AJ.** The cell membrane plays a crucial role in survival of bacteria and archaea in extreme environments. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2002; 81: 61-72.
127. **Konishi N, Torii Y, Kurosaki A, Takatsuka T, Itota T, Yoshiyama M.** Confocal laser scanning microscopic analysis of early plaque formed on resin composite and human enamel. *J Oral Rehabil* 2003; 30: 790-795.
128. **Korber DR, Lawrence JR, Hendry MJ, Caldwell DE.** Analysis of spatial variability within mot⁺ and mot⁻ *Pseudomonas fluorescens* biofilms using representative elements. *Biofouling* 1993; 7: 339-358.

129. **Lahtinen SJ, Gueimonde M, Ouwehand AC, Reinikainen JP, Salminen SJ.** Comparison of four methods to enumerate probiotic bifidobacteria in a fermented food product. *Food Microbiol* 2006; 23: 571-577.
130. **Lamfon H, Al-Karaawi Z, McCullough M, Porter SR, Pratten J.** Composition of *in vitro* denture plaque biofilms and susceptibility to antifungals. *FEMS Microbiol Lett* 2005; 242: 345-351.
131. **Landa AS, van der Mei HC, Busscher HJ.** Detachment of linking film bacteria from enamel surfaces by oral rinses and penetration of sodium lauryl sulphate through an artificial oral biofilm. *Adv Dent Res* 1997; 11: 528-538.
132. **Larsen T, Fiehn NE.** Development of a flow method for susceptibility testing of oral biofilms *in vitro*. *APMIS* 1995; 103: 339-344.
133. **Larsen T, Fiehn NE.** Resistance of *Streptococcus sanguis* biofilms to antimicrobial agents. *APMIS* 1996; 104: 280-284.
134. **Lawrence JR, Korber DR, Hoyle BD, Costerton JW, Caldwell DE.** Optical sectioning of microbial biofilms. *J Bacteriol* 1991; 173: 6558-6567.
135. **Lendenmann U, Grogan J, Oppenheim FG.** Saliva and dental pellicle - a review. *Adv Dent Res* 2000; 14: 22-28.
136. **Lehtinen J, Nuutila J, Lilius EM.** Green fluorescent protein-propidium iodide (GFP-PI) based assay for flow cytometric measurement of bacterial viability. *Cytometry A* 2004; 60: 165-172.

137. **Lewandowski Z, Altobelli SA, Majors PD, Fukushima E.** NMR imaging of hydrodynamics near microbially colonized surfaces. *Water Sci Technol* 1992; 26: 577-584.

138. **Li YH, Lau PC, Lee JH, Ellen RP, Cvitkovitch DG.** Natural genetic transformation of *Streptococcus mutans* growing in biofilms. *J Bacteriol* 2001; 183: 897-908.

139. **Li YH, Tang N, Aspiras MB, Lau PC, Lee JH, Ellen RP, Cvitkovitch DG.** A quorum-sensing signaling system essential for genetic competence in *Streptococcus mutans* is involved in biofilm formation. *J Bacteriol* 2002a; 184: 2699-2708.

140. **Li YH, Lau PC, Tang N, Svensäter G, Ellen RP, Cvitkovitch DG.** Novel two-component regulatory system involved in biofilm formation and acid resistance in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol* 2002b; 184: 6333-6342.

141. **Li J, Helmerhorst EJ, Leone CW, Troxler RF, Yaskell T, Haffajee AD, Socransky SS, Oppenheim FG.** Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. *J Appl Microbiol* 2004; 97: 1311-1318.

142. **Listgarten MA.** Structure of the microbial flora associated with periodontal health and disease in man. A light and electron microscopic study. *J Periodontol* 1976; 47: 1-18.

143. **Listgarten MA, Mayo HE, Tremblay R.** Development of dental plaque on epoxy resin crowns in man. A light and electron microscopic study. *J Periodontol* 1975; 46: 10-26.

- 144. Loivukene K, Pähkla ER, Koppel T, Saag M, Naaber P.** The microbiological status of patients with periodontitis in southern Estonia after non-surgical periodontal therapy. *Stomatologija* 2005; 7: 45-47.
- 145. Mah TF, O'Toole GA.** Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* 2001; 9: 34-39.
- 146. Marsh PD.** Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res* 1994; 8: 263-271.
- 147. Marsh PD.** Plaque as a biofilm: pharmacological principles of drug delivery and action in the sub- and supragingival environment. *Oral Dis* 2003; 9: 16-22.
- 148. Marsh PD.** Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Res* 2004; 38: 204-211.
- 149. Marsh PD.** Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. *J Clin Periodontol* 2005; 32: 7-15.
- 150. Marsh PD, Bradshaw DJ.** Microbiological effects of new agents in dentifrices for plaque control. *Int Dent J* 1993; 43: 399-406.
- 151. Marsh PD, Bradshaw DJ.** Dental plaque as a biofilm. *J Ind Microbiol* 1995; 15: 169-175.
- 152. Marsh PD, Bradshaw DJ.** Microbial community aspects of dental plaque. En: Dental plaque revisited: oral biofilms in health and disease. Newman HN, Wilson M (eds). Cardiff: Bioline, Cardiff, 1999, pp 237-253.

153. **Marsh PD, Martin MV.** Oral microbiology. 4th ed. Wright, Oxford, 1999, pp 58-81.
154. **Marshall KC.** Interfaces in microbial ecology. Harvard University Press, Cambridge (Massachusetts), 1976, pp 44-47.
155. **McBain AJ.** Chapter 4: *In vitro* biofilm models: an overview. *Adv Appl Microbiol* 2009; 69: 99-132.
156. **McCann KS.** The diversity-stability debate. *Nature* 2000; 405: 228-233.
157. **McDonnell G, Russell AD.** Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 147-179.
158. **McFarland LV.** Normal flora: diversity and functions. *Microb Ecol Health Dis* 2000; 12: 193-207.
159. **McHugh WD.** Dental plaque: thirty years on. En: Dental plaque revisited: oral biofilms in health and disease. Newman HN, Wilson M (eds): Cardiff: Bioline, Cardiff, 1999, pp 1-4.
160. **Melsen B, Kaae O, Rølla G.** Penetration of fluoride and chlorhexidine in human dental plaque *in vitro*. *Caries Res* 1983; 17: 113-117.
161. **Millward TA, Wilson M.** The effect of chlorhexidine on *Streptococcus sanguis* biofilms. *Microbios* 1989; 58: 155-164.
162. **Moran J, Addy M, Wade WG, Maynard JH, Roberts SE, Aström M, Møvert R.** A comparison of delmopinol and

chlorhexidine on plaque regrowth over a 4-day period and salivary bacterial counts. *J Clin Periodontol* 1992; 19: 749-753.

163. **Moran J, Addy M, Wade W, Milson S, McAndrew R, Newcombe RG.** The effect of oxidising mouthrinses compared with chlorhexidine on salivary bacterial counts and plaque regrowth. *J Clin Periodontol* 1995; 22: 750-755.
164. **Nadkarni MA, Martin FE, Jacques NA, Hunter N.** Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology* 2002; 148: 257-266.
165. **Nagaoka S, Hojo K, Murata S, Mori T, Ohshima T, Maeda N.** Interactions between salivary *Bifidobacterium adolescentis* and other oral bacteria: *in vitro* coaggregation and coadhesion assays. *FEMS Microbiol Lett* 2008; 281: 183-189.
166. **Navazesh M, Christensen CM.** A comparison of whole mouth resting and stimulated salivary measurement procedures. *J Dent Res* 1982; 61: 1158-1162.
167. **Netuschil L.** Vital staining of plaque microorganisms using fluorescein diacetate and ethidium bromide. *Dtsch Zahnarztl Z* 1983; 38: 914-917.
168. **Netuschil L, Reich E, Brex M.** Direct measurement of the bactericidal effect of chlorhexidine on human dental plaque. *J Clin Periodontol* 1989; 16: 484-488.

169. **Netuschil L, Weiger R, Preisler R, Brex M.** Plaque bacteria counts and vitality during chlorhexidine, meridol and listerine mouthrinses. *Eur J Oral Sci* 1995; 103: 355-361.

170. **Netuschil L, Rauh T, Riethe P.** Substantivität und antibakterielle Wirkung von Aminfluorid/Zinnfluorid *in situ*. *Parodontologie* 1997; 8: 7-16.

171. **Netuschil L, Reich E, Unteregger G, Sculean A, Brex M.** A pilot study of confocal laser scanning microscopy for the assessment of undisturbed dental plaque vitality and topography. *Arch Oral Biol* 1998; 43: 277-285.

172. **Nickel JC, Ruseska I, Wright JB, Costerton JW.** Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary catheter material. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; 27: 619-624.

173. **Nyvad B, Fejerskov O.** Scanning electron microscopy of early microbial colonization of human enamel and root surfaces *in vivo*. *Scand J Dent Res* 1987a; 95: 287-296.

174. **Nyvad B, Fejerskov O.** Transmission electron microscopy of early microbial colonization of human enamel and root surfaces *in vivo*. *Scand J Dent Res* 1987b; 95: 297-307.

175. **Nyvad B, Fejerskov O.** Structure of dental plaque and the plaque-enamel interface in human experimental caries. *Caries Res* 1989; 23: 151-158.

176. **Nyvad B, Kilian M.** Microbiology of the early colonization of human enamel and root surfaces *in vivo*. *Scand J Dent Res* 1987; 95: 369-380.
177. **Nobbs AH, Lamont RJ, Jenkinson HF.** *Streptococcus* adherence and colonization. *Microbiol Mol Biol Rev* 2009; 73: 407-450.
178. **Palmer RJ Jr.** Supragingival and subgingival plaque: paradigm of biofilms. *Compend Contin Educ Dent* 2010; 31: 104-138.
179. **Palmer RJ Jr, Wu R, Gordon S, Bloomquist CG, Liljemark WF, Kilian M, Kolenbrander PE.** Retrieval of biofilms from the oral cavity. *Methods Enzymol* 2001; 337: 393-403.
180. **Palmer RJ Jr, Gordon SM, Cisar JO, Kolenbrander PE.** Coaggregation-mediated interactions of streptococci and actinomyces detected in initial human dental plaque. *J Bacteriol* 2003; 185: 3400-3409.
181. **Palmer RJ Jr, Diaz PI, Kolenbrander PE.** Rapid succession within the *Veillonella* population of a developing human oral biofilm *in situ*. *J Bacteriol* 2006; 188: 4117-4124.
182. **Perez Davidi M, Beyth M, Sterer N, Feuerstein O, Weiss EI.** Effect of liquid-polish coating on *in vivo* biofilm accumulation on provisional restorations: part 1. *Quintessence Int* 2007; 38: 591-596.
183. **Peters AC, Wimpenny JW.** A constant-depth laboratory model film fermentor. *Biotechnol Bioeng* 1988; 32: 263-270.

184. **Pitten FA, Kramer A.** Antimicrobial efficacy of antiseptic mouthrinse solutions. *Eur J Clin Pharmacol* 1999; 55: 95-100.
185. **Pratten J.** Growing oral biofilms in a constant depth film fermentor. *Curr Protoc Microbiol* 2007; Chapter 1: Unit 1B.5.
186. **Pratten J, Wilson M.** Antimicrobial susceptibility and composition of microcosm dental plaques supplemented with sucrose. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1595-1599.
187. **Pratten J, Barnett P, Wilson M.** Composition and susceptibility to chlorhexidine of multispecies biofilms of oral bacteria. *Appl Environ Microbiol* 1998a; 64: 3515-3519.
188. **Pratten J, Smith AW, Wilson M.** Response of single species biofilms and microcosm dental plaques to pulsing with chlorhexidine. *J Antimicrob Chemother* 1998b; 42: 453-459.
189. **Pratten J, Wills K, Barnett P, Wilson M.** *In vitro* studies of the effect of antiseptic-containing mouthwashes on the formation and viability of *Streptococcus sanguis* biofilms. *J Appl Microbiol* 1998c; 84: 1149-1155.
190. **Pratten J, Andrews CS, Craig DQ, Wilson M.** Structural studies of microcosm dental plaques grown under different nutritional conditions. *FEMS Microbiol Lett* 2000; 189: 215-218.
191. **Quirynen M, Vogels R, Pauwels M, Haffajee AD, Socransky SS, Uzel NG, van Steenberghe D.** Initial subgingival colonization of “pristine” pockets. *J Dent Res* 2005; 84: 340-344.

192. **Reynolds S, Moran J, Addy M, Wade WG, Newcombe R.** Taurolin as an oral rinse. I. Antimicrobial effects *in vitro* and *in vivo*. *Clin Prev Dent* 1991; 13: 13-17.

193. **Roberts SK, Bass C, Brading M, Lappin-Scott H, Stoodley P.** Biofilm formation and structure; What's new?. En: Dental plaque revisited: oral biofilms in health and disease. Newman HN, Wilson M (eds). Cardiff: Bioline, Cardiff, 1999, pp 15-36.

194. **Roberts SK, Wei GX, Wu CD.** Evaluating biofilm growth of two oral pathogens. *Lett Appl Microbiol* 2002; 35: 552-556.

195. **Robinson C, Kirkham J, Percival R, Shore RC, Bonass WA, Brookes SJ, Kusa L, Nakagaki H, Kato K, Nattress B.** A method for the quantitative site-specific study of the biochemistry within dental plaque biofilms formed *in vivo*. *Caries Res* 1997; 31: 194-200.

196. **Robinson C, Strafford S, Rees G, Brookes SJ, Kirkham J, Shore RC, Watson PS, Wood S.** Plaque biofilms: the effect of chemical environment on natural human plaque biofilm architecture. *Arch Oral Biol* 2006; 51: 1006-1014.

197. **Rolland SL, McCabe JF, Robinson C, Walls AW.** *In vitro* biofilm formation on the surface of resin-based dentine adhesives. *Eur J Oral Sci* 2006; 114: 243-249.

198. **Rosin M, Welk A, Bernhardt O, Ruhnau M, Pitten FA, Kocher T, Kramer A.** Effect of a polyhexamethylene biguanide mouthrinse on bacterial counts and plaque. *J Clin Periodontol* 2001; 28: 1121-1126.

199. **Rosin M, Welk A, Kocher T, Majic-Todt A, Kramer A, Pitten FA.** The effect of a polyhexamethylene biguanide mouthrinse compared to an essential oil rinse and a chlorhexidine rinse on bacterial counts and 4-day plaque regrowth. *J Clin Periodontol* 2002; 29: 392-399.

200. **Rozen R, Bachrach G, Zachs B, Steinberg D.** Growth rate and biofilm thickness of *Streptococcus sobrinus* and *Streptococcus mutans* on hydroxapatite. *APMIS* 2001; 109: 155-160.

201. **Sanders WE, Sanders CC.** Modification of normal flora by antibiotics: effects on individuals and the environment. En: *New dimensions in antimicrobial therapy. Contemporary issues in infectious diseases series*. Koot RK, Sande MA (eds). Churchill Livingstone, New York, 1984, pp 217-241.

202. **Scannapieco FA.** Saliva-bacterium interactions in oral microbial ecology. *Crit Rev Oral Biol Med* 1994; 5: 203-248.

203. **Schaudinn C, Carr G, Gorur A, Jaramillo D, Costerton JW, Webster P.** Imaging of endodontic biofilms by combined microscopy (FISH/CLSM-SEM). *J Microsc* 2009; 235: 124-127.

204. **Scheie AA.** Mechanisms of dental plaque formation. *Adv Dent Res* 1994; 8: 246-253.

205. **Scheie AA, Petersen FC.** The biofilm concept: consequences for future prophylaxis of oral diseases? *Crit Rev Oral Biol Med* 2004; 15: 4-12.

- 206. Schiött CR, Loe H, Jensen SB, Kilian M, Davies RM, Glavind K.** The effect of chlorhexidine mouthrinses on the human oral flora. *J Periodontal Res* 1970; 5: 84-89.
- 207. Sedlacek MJ, Walker C.** Antibiotic resistance in an *in vitro* supragingival biofilm model. *Oral Microbiol Immunol* 2007; 22: 333-339.
- 208. Sekino S, Ramberg P, Uzel NG, Socransky S, Lindhe J.** Effect of various chlorhexidine regimens on salivary bacteria and *de novo* plaque formation. *J Clin Periodontol* 2003; 30: 919-925.
- 209. Serrano-Granger J, Herrera D.** La placa dental como biofilm. ¿Cómo eliminarla? *RCOE* 2005; 10: 431-439.
- 210. Shapiro S, Giertsen E, Guggenheim B.** An *in vitro* oral biofilm model for comparing the efficacy of antimicrobial mouthrinses. *Caries Res* 2002; 36: 93-100.
- 211. Shemesh H, Goertz DE, van der Sluis LW, de Jong N, Wu MK, Wesselink PR.** High frequency ultrasound imaging of a single-species biofilm. *J Dent* 2007; 35: 673-678.
- 212. Simonsson T, Hvid EB, Rundegren J, Edwardsson S.** Effect of delmopinol on *in vitro* dental plaque formation, bacterial acid production and the number of microorganisms in human saliva. *Oral Microbiol Immunol* 1991; 6: 305-309.
- 213. Singh MP.** Rapid test for distinguishing membrane-active antibacterial agents. *J Microbiol Methods* 2006; 67: 125-130.

214. **Singleton S, Treloar R, Warren P, Watson GK, Hodgson R, Allison C.** Methods for microscopic characterization of oral biofilms: analysis of colonization, microstructure, and molecular transport phenomena. *Adv Dent Res* 1997; 11: 133-149.
215. **Sissons CH, Wong L, Cutress TW.** Inhibition by ethanol of the growth of biofilm and dispersed microcosm dental plaque. *Arch Oral Biol* 1996; 41: 27-34.
216. **Slavkin HC.** Biofilms, microbial ecology and Antoni van Leeuwenhoek. *J Am Dent Assoc* 1997; 128: 492-495.
217. **Socransky SS, Haffajee AD.** Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000* 2002; 28: 12-55.
218. **Sreenivasan PK, Gittins E.** Effects of low dose chlorhexidine mouthrinses on oral bacteria and salivary microflora including those producing hydrogen sulfide. *Oral Microbiol Immunol* 2004a; 19: 309-313.
219. **Sreenivasan PK, Gittins E.** The effects of a chlorhexidine mouthrinse on culturable microorganisms of the tongue and saliva. *Microbiol Res* 2004b; 159: 365-370.
220. **Sreenivasan PK, Mattai J, Nabi N, Xu T, Gaffar A.** A simple approach to examine early oral microbial biofilm formation and the effects of treatments. *Oral Microbiol Immunol* 2004; 19: 297-302.
221. **Stanley A, Wilson M, Newman HN.** The *in vitro* effects of chlorhexidine on subgingival plaque bacteria. *J Clin Periodontol* 1989; 16: 259-264.

- 222. Stewart PS.** A review of experimental measurements of effective diffusive permeabilities and effective diffusion coefficients in biofilms. *Biotechnol Bioeng* 1998; 59: 261-272.
- 223. Stewart PS.** Diffusion in biofilms. *J Bacteriol* 2003; 185: 1485-1491.
- 224. Stewart PS, Rayner J, Roe F, Rees WM.** Biofilm penetration and disinfection efficacy of alkaline hypochlorite and chlorosulfamates. *J Appl Microbiol* 2001; 91: 525-532.
- 225. Takahashi Y, Konishi K, Cisar JO, Yoshikawa M.** Identification and characterization of hsa, the gene encoding the sialic acid-binding adhesin of *Streptococcus gordonii* DL1. *Infect Immun* 2002; 70: 1209-1218.
- 226. Takenaka S, Trivedi HM, Corbin A, Pitts B, Stewart PS.** Direct visualization of spatial and temporal patterns of antimicrobial action within model oral biofilms. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74: 1869-1875.
- 227. Tang G, Yip HK, Cutress TW, Samaranayake LP.** Artificial mouth model systems and their contribution to caries research: a review. *J Dent* 2003; 31: 161-171.
- 228. Tatevossian A.** The effects of heat inactivation, tortuosity, extracellular polyglucan and ion-exchange sites on the diffusion of (¹⁴C-sucrose) in human dental plaque residue *in vitro*. *Arch Oral Biol* 1985; 30: 365-371.
- 229. ten Cate JM.** Biofilms, a new approach to the microbiology of dental plaque. *Odontology* 2006; 94: 1-9.

230. **ten Cate JM, Marsh PD.** Procedures for establishing efficacy of antimicrobial agents for chemotherapeutic caries prevention. *J Dent Res* 1994; 73: 695-703.
231. **Tenovuo J.** Antimicrobial function of human saliva--how important is it for oral health? *Acta Odontol Scand* 1998; 56: 250-256.
232. **Thrower Y, Pinney RJ, Wilson M.** Susceptibilities of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* biofilms to oral antiseptics. *J Med Microbiol* 1997; 46: 425-429.
233. **Thurnheer T, Gmür R, Shapiro S, Guggenheim B.** Mass transport of macromolecules within an *in vitro* model of supragingival plaque. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69: 1702-1709.
234. **Tomás I, Cousido MC, Tomás M, Limeres J, García-Caballero L, Diz P.** *In vivo* bactericidal effect of 0.2% chlorhexidine but not 0.12% on salivary obligate anaerobes. *Arch Oral Biol* 2008; 53: 1186-1191.
235. **Tomás I, García-Caballero L, Cousido MC, Limeres J, Álvarez M, Diz P.** Evaluation of chlorhexidine substantivity on salivary flora by epifluorescence microscopy. *Oral Dis* 2009; 15: 428-433.
236. **Tomás I, Cousido MC, García-Caballero L, Rubido S, Limeres J, Diz P.** Substantivity of a single chlorhexidine mouthwash on salivary flora: influence of intrinsic and extrinsic factors. *J Dent* 2010a; 38: 541-546.

237. **Tomás I, Henderson B, Diz P, Donos N.** *In vivo* oral biofilm analysis by confocal laser scanning microscopy: methodological approaches. En: Microscopy: Science, technology, applications and education. Microscopy series nº4 (vol.1). Méndez-Vilas A, Díaz J (eds). Formatex, Badajoz, 2010b, pp 597-606.
238. **van der Mei HC, White DJ, Atema-Smit J, van de Belt-Gritter E, Busscher HJ.** A method to study sustained antimicrobial activity of rinse and dentifrice components on biofilm viability *in vivo*. *J Clin Periodontol* 2006; 33: 14-20.
239. **van der Mei HC, Engels E, de Vries J, Busscher HJ.** Effects of amine fluoride on biofilm growth and salivary pellicles. *Caries Res* 2008; 42: 19-27.
240. **van Steenberghe TJ, van Winkelhoff AJ, de Graaff J.** Pathogenic synergy: mixed infections in the oral cavity. *Antonie van Leeuwenhoek* 1984; 50: 789-798.
241. **Vitkov L, Hermann A, Krautgartner WD, Herrmann M, Fuchs K, Klappacher M, Hannig M.** Chlorhexidine-induced ultrastructural alterations in oral biofilm. *Microsc Res Tech* 2005; 68: 85-89.
242. **von Ohle C, Gieseke A, Nistico L, Decker EM, DeBeer D, Stoodley P.** Real-time microsensor measurement of local metabolic activities in *ex vivo* dental biofilms exposed to sucrose and treated with chlorhexidine. *Appl Environ Microbiol* 2010; 76: 2326-2334.
243. **Walker C, Sedlacek MJ.** An *in vitro* biofilm model of subgingival plaque. *Oral Microbiol Immunol* 2007; 22: 152-161.

244. **Watson PS, Pontefract HA, Devine DA, Shore RC, Nattress BR, Kirkham J, Robinson C.** Penetration of fluoride into natural plaque biofilms. *J Dent Res* 2005; 84: 451-455.
245. **Wecke J, Kersten T, Madela K, Moter A, Göbel UB, Friedmann A, Bernimoulin J.** A novel technique for monitoring the development of bacterial biofilms in human periodontal pockets. *FEMS Microbiol Lett* 2000; 191: 95-101.
246. **Weiger R, Netuschil L, von Ohle C, Brex M.** Microbial vitality of supragingival dental plaque during initial stages of experimental gingivitis in humans. *J Periodontal Res* 1995; 30: 204-209.
247. **Weiger R, von Ohle C, Decker EM, Axmann-Krcmar D, Netuschil L.** Vital microorganisms in early supragingival dental plaque and in stimulated human saliva. *J Periodontal Res* 1997; 32: 233-240.
248. **Weiger R, Netuschil L, Wester-Ebbinghaus T, Brex M.** An approach to differentiate between antibacterial and antiadhesive effects of mouthrinses *in vivo*. *Arch Oral Biol* 1998; 43: 559-565.
249. **Weiger R, Decker EM, Krastl G, Brex M.** Deposition and retention of vital and dead *Streptococcus sanguinis* cells on glass surfaces in a flow-chamber system. *Arch Oral Biol* 1999; 44: 621-628.
250. **Wilson M.** Susceptibility of oral bacterial biofilms to antimicrobial agents. *J Med Microbiol* 1996; 44: 79-87.

251. **Wilson M.** Use of constant depth film fermentor in studies of biofilms of oral bacteria. *Methods Enzymol* 1999; 310: 264-279.
252. **Wilson M, Pratten J.** Laboratory assessment of antimicrobials for plaque-related diseases. En: Dental plaque revisited: oral biofilms in health and disease. Newman HN, Wilson M (eds). Cardiff: Bioline, Cardiff, 1999.
253. **Wilson M, Patel H, Fletcher J.** Susceptibility of biofilms of *Streptococcus sanguis* to chlorhexidine gluconate and cetylpyridinium chloride. *Oral Microbiol Immunol* 1996; 11: 188-192.
254. **Wilson M, Patel H, Noar JH.** Effect of chlorhexidine on multi-species biofilms. *Curr Microbiol* 1998; 36: 13-18.
255. **Wimpenny J.** Biofilms: structure and organisation. *Microb Ecol Health Dis* 1995; 8: 305-308.
256. **Wirthlin MR, Chen PK, Hoover CI.** A laboratory model biofilm fermenter: design and initial trial on a single species biofilm. *J Periodontol* 2005; 76: 1443-1449.
257. **Wolfaardt GM, Lawrence JR, Robarts RD, Caldwell SJ, Caldwell DE.** Multicellular organization in a degradative biofilm community. *Appl Environ Microbiol* 1994; 60: 434-446.
258. **Wood S, Nattress B, Kirkham J, Shore R, Brookes S, Griffiths J, Robinson C.** An *in vitro* study of the use of photodynamic therapy for the treatment of natural oral plaque biofilms formed *in vivo*. *J Photochem Photobiol B* 1999; 50: 1-7.

259. **Wood SR, Kirkham J, Marsh PD, Shore RC, Nattress B, Robinson C.** Architecture of intact natural human plaque biofilms studied by confocal laser scanning microscopy. *J Dent Res* 2000; 79: 21-27.
260. **World Health Organization.** Oral health surveys, Basic methods, 4th ed. WHO: Geneva, 1997.
261. **Wright SJ, Wright DJ.** Introduction to confocal microscopy. *Methods Cell Biol* 2002; 70: 1-85.
262. **Yao Y, Berg EA, Costello CE, Troxler RF, Oppenheim FG.** Identification of protein components in human acquired enamel pellicle and whole saliva using novel proteomics approaches. *J Biol Chem* 2003; 278: 5300-5308.
263. **Zanin IC, Goncalves RB, Junior AB, Hope CK, Pratten J.** Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an *in vitro* study. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56: 324-330.
264. **Zaura-Arite E, van Marle J, ten Cate JM.** Confocal microscopy study of undisturbed and chlorhexidine-treated dental biofilm. *J Dent Res* 2001; 80: 1436-1440.
265. **Zhang TC, Bishop PL.** Evaluation of tortuosity factors and effective diffusivities in biofilms. *Water Res* 1994; 28: 2279-2287.
266. **Zobell CE.** The effect of solid surfaces upon bacterial activity. *J Bacteriol* 1943; 46: 39-56.